

TARTU ÜLIKOOL

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Keemia instituut

Bioorgaanilise keemia õppetool

Elen Laaneväli

**Erinevate G-valk seotud retseptorite signaaliradade koondamine
cAMP väljundiks, kasutades kimäärseid G-valke ja BacMam
tehnoloogiat**

Bakalaureusetöö (6 EAP)

Keemia

Juhendajad:

Santa Veikšina, PhD

Sergei Kopantšuk, PhD

Tartu 2020

INFOLEHT

Erinevate G-valk seotud retseptorite signaaliradade koondamine cAMP väljundiks, kasutades kimäärseid G-valke ja BacMam tehnoloogiat

Käesolevas töös uuriti GPCR vahendatud signaaliradu kasutades selleks kimäärseid G-valke. GsX konstruktid põhjustavad aktiveerudes rakus cAMP-i taseme tõusu, mille reaal-ajalisi muutusi on võimalik jälgida rakendades FRET-il põhinevat cAMP biosensorit. Kimäärsete G-valkude ja biosensori ekspressiooniks imetajarakkudes genereeriti rekombinantsed bakuloviirused. Süsteemi valideerimiseks teostati katsed valitud retseptoritega, mis näitab, et antud süsteemiga on õnnestunud signaaliradu koondada.

Märksõnad: GPCR, signaalirajad, kimäärsed GsX valgud, EPAC biosensor, BacMam tehnoloogia, cAMP.

CERCS koodid: P310 Proteiinid, ensüümoloogia; B740 Farmakoloogia; B120 Molekulaarne biofüüsika;

Consolidation of different G protein-coupled receptor signaling pathways for cAMP output using chimeric G proteins and BacMam technology

In the present work, GPCR-mediated signaling pathways were studied using chimeric G proteins. The GsX constructs, upon activation, cause an increase in the level of cAMP in the cell, which can be monitored using a FRET-based cAMP biosensor. Recombinant baculoviruses were generated for the expression of chimeric G proteins and the biosensor in mammalian cells. To validate the system, experiments were performed with selected receptors, indicating that the signal pathways have been successfully redirected with this system.

Keywords: GPCR, signaling pathways, chimeric GsX proteins, EPAC biosensor, BacMam technology, cAMP.

CERCS codes: P310 Proteins, enzymology; B740 Pharmacological sciences; B120 Molecular biophysics

SISUKORD

1 KASUTATUD LÜHENDID	5
2 SISSEJUHATUS	7
3 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
3.1 Transmembraanne signaaliülekanne.....	8
3.1.1 G-valk seotud retseptorid	8
3.1.2 G-valgud ja nende roll signaalülekandes	9
3.1.3 Modifitseeritud G-valgud	11
3.2 Sissejuhatus metoodikatesse	13
3.2.1 cAMP-i määramise meetodid	13
3.2.1.1 Epac valgul põhinevad FRET biosensorid	14
3.2.2 BacMam tehnoloogia	15
3.2.3 Bakuloviiruste tiitri määramine	16
4 EKSPERIMENTAALNE OSA	18
4.1 Materjalid ja aparatuur.....	18
4.2 GsX konstrukti kodeeriva bakuloviiruse loomine	19
4.2.1 pFastBac TM 1_GsX plasmiidide konstrueerimine	19
4.2.2 Rekombinantsete bakmiidide genereerimine	21
4.2.3 Rekombinantsete bakuloviiruste tootmine Sf9 rakkudes	21
4.2.4 Bakuloviiruste kontsentratsiooni määramine	21
4.3 Biosensorit kodeeriva viirusega CHO-K1-OX1 rakkude nakatamine	22
4.4 Seostumiskatsed imetajarakkudes	23
5 TULEMUSED JA ARUTELU	24
5.1 Kimäärseid G-valke kodeeriva BacMam süsteemi loomine	24
5.3 Epac-S ^{H187} biosensori taseme optimeerimine	25
5.4 GsX konstruktide ekspressiooni mõju rakkudele	26
5.5 Ligandide mõju analüüs imetajarakkudes	27
6 KOKKUVÕTE.....	32

7 SUMMARY	33
8 KASUTATUD KIRJANDUS	34
9 LISAD.....	38

1 KASUTATUD LÜHENDID

AC – adenülaadi tsüklaas

AcMNPV – *Autographa californica* multikapsiidne nukleopolühedroviirus

ATP – adenosiin-5'-trifosfaat

BacMam – geeni ülekanne imetajarakkudesse bakuloviiruse abil (*baculovirus gene transfer into mammalian cells*)

bp – aluspaar (*base pair*)

cAMP – tsükliline adenosiin-3',5'-monofosfaat

CCh – karbakoliin

CFP – helesinine fluorestseeruv valk (*cyan fluorescent protein*)

CHO-K1-OX1 – oreksiin-1 retseptorit ekspresseeriv Hiina hamstri munasarja rakuliin

DNA – desoksüribonukleiinhape

DPBS – fosfaatpuhverdatud soolalahus (*Dulbecco's phosphate-buffered saline*)

E.coli – *Escherichia coli*, gram-negatiivne bakter

EDTA – etüleendiamiintetraatsetaat

Epac – cAMP efektorvalk (*exchange protein directly activated by cAMP*)

FRET – Försteri resonantsenergia ülekanne

GDP – guanosiindifosfaat

GPCR – G-valk seotud retseptorid (*G protein-coupled receptor*)

GTP – guanosiintrifosfaat

G-valk – guaniinnukleotiide siduv regulaatorvalk

IBMX – 3-isobutüül-1-metüülksantiin

ICSE – pildianalüüsil põhinev raku suuruse hindamine (*image-based cell size estimation*)

ivp – nakatusvõimeline viirusosake (*infectious viral particle*)

kb – kiloaluspaar (*kilobases*)

LB – bakterisööde (*L-Broth; Luria Bertani*)

MOI – nakatuskordsus (*multiplicity of infection*)

NA – noradrenaliin

NECA – 5'-N-etüülkarboksamidoadenosiin

PCR – polümeraas ahelreaktsioon (*polymerase chain reaction*)

PDE – fosfodiesteraas

PEG – polüetüleenglükool

PKA – cAMP-sõltuv proteiinkinaas A

Sf9 – *Spodoptera frugiperda* putuka munasarjast eraldatud rakuliin

SFCA – pindaktiivsete ainete vaba tselluloosatsetaat (*surfactant-free cellulose acetate*)

SOC – bakterisööde (*super optimal broth with catabolite repression*)

Tris – tris(hüdroksümetüül)aminometaan

U2OS rakuliin – inimese osteosarkoomist algatatud rakuliin

X-Gal – bromo-kloro-indolüül-galaktopüranosiid

YFP – kollane fluorestseeruv valk (*yellow fluorescent protein*)

P – tõstearv (*passage*)

2 SISSEJUHATUS

Rakkude normaalse talituse aluseks on rakkudevaheline suhtlus ehk signaaliülekanne, mida vahendavad retseptorid. Kõige levinum membraansete retseptorite klass on G-valk seotud retseptorid (GPCR), mis omavad keskset rolli nii füsioloogilistes kui ka patoloogilistes protsessides. Muutused retseptori aktiivsuses võivad põhjustada haiguslikke seisundeid, mistõttu on nad olulised ravimite märklauad ja ligikaudu 36% turul olevatest ravimitest on suunatud GPCR-le. Uute ravimite väljatöötamine nõuab ulatuslikke teadmisi signaaliradade mehhanismidest. Potentsiaalikamaid valdkondi on orb-retseptorite uurimine, kuid mille aktivatsiooni mõõtmiseks puuduvad universaalsed meetodid.

Üheks võimaluseks on erinevad signaalirajad koondada kasutades kimäärseid G-valke. Kimäärsetel G-valkudel on modifitseeritud lühike C-terminaalis asuv järjestus, mis pärineb teisest G-valgust, ja põhiosa, mis vastutab kindla signaaliraja aktiveerimise eest. Ekspresseerides neid valke rakus, on võimalik signaaliradu ümber suunata näiteks cAMP signaalirajale.

Käesoleva töö eesmärk oli välja arendada uus meetod, mis kasutab erinevate signaaliradade uurimiseks kimäärseid G-valke, mille indutseeritud vastust mõõdetakse FRET-il põhineva biosensoriga.

3 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

3.1 Transmembraanne signaaliülekanne

3.1.1 G-valk seotud retseptorid

Rakud peavad reageerima väliskeskkonna stiimulitele, et tagada normaalne talitus ja areng. Paljud neist stiimulitest on keemilised – mediaatorid, hormoonid, virgatsained jt, mis paljudel juhtudel on eritatud ühe raku poolt ja põhjustavad reaktsiooni teises rakus. Sellist olukorda, kus väline signaal põhjustab muutuse raku sees, nimetatakse transmembraanseks signaaliülekanneks. Signaalide vastu võtmiseks on rakkude pinnal spetsiaalsed valgud, mida nimetatakse retseptoriteks. Kõige suurem membraansete retseptorite klass on G-valk seotud retseptorid (GPCR), mis osalevad rakusisestes protsessides, aga mõjutavad ka füsioloogilisi protsesse nagu vererõhku, närvisüsteemi ülekannet, nägemist ja isegi maitsmismeelt (Lodish *et al.* 2016; Zalewska *et al.* 2014). Muutused retseptori aktiivuses võivad põhjustada haiguslikke seisundeid või rikkuda raku normaalse talitluse ja näiteks viia vähkkasvaja tekkeni. Nendel põhjustel on G-valk seotud retseptorid olulised ravimite märklauad ja ligikaudu 36% turul olevatest ravimitest on suunatud GPCR-le (Sriram and Insel 2018). Siiski on GPCR-le suunatud ravimitel veel palju potentsiaali, arvestades et ligi kolmandikul retseptoritest pole teada ligande, tuntud kui orb-retseptorid (Hauser *et al.* 2020).

Kõikidel GPCR-del on rakuväline ligandi siduv osa, seitsmest hüdrofoobsest transmembraanses osast koosnev helikaalne domeen (TMDs), mida ühendavad rakuvälised ja -sisesed aasad, ja tsütosoolne osa. Vaatamata sarnasele üldstruktuurile jagunevad GPCR-d kuude erinevasse perekonda järjestuse ja funktsiooni sarnasuse alusel (Hu *et al.* 2017). Variatsioonid rakuvälistes aasades, transmembraanses osas ja kõrvalahelates mõjutavad ligandi sidumistasku kuju, suurust ja interaktsioonide omadusi. GPCR-de struktuursed erinevused võimaldavad siduda väga erinevate biokeemiliste omadustega ligande: hormoonid, neurotransmitterid, peptiidid, lipiidid, metallioonid jt (Vsevolod *et al.* 2013). Ligandid saab jaotada nelja klassi vahel sõltuvalt nende mõjust retseptori struktuurile ja bioloogilisele vastusele: täisagonist, annab seostudes maksimaalse efekti; osaline agonist, sarnane toime täisagonistiga, aga ei põhjusta täisefekti; antagonist, seondudes retseptorit ei aktiveeri, aga blokeerib sidumiskoha; ja pöördagonist, avaldab vastupidist efekti agonistile (Bindslev 2008).

Signaaliülekanne algatamiseks peab GPCR inaktiivne olek üle minema aktiveeritud olekusse. Energeetiliselt on see kõige soodsam agonisti seostumisel, aga üleminek esineb ka agonisti puudumisel, mida tuntakse konstitutiivse aktiivsusega. Konstitutiivse aktiivsuse tase retseptoritel erineb ja on mõjutatud ka keskkonna keemiliste omaduste poolt (Wootten *et al.* 2018). On näidatud, et Zn^{2+} ja Cu^{2+} ioonid võivad konstitutiivse aktiivsuse taset tõsta või langetada (Link *et al.* 2020). Agonisti seostumine retseptoriga põhjustab konformatsioonilisi muudatusi transmembraanses ja tsütosoolses osas, mis võimaldab seonduda G-valkudega (guaniinnukleotiidi siduv regulaatorvalk), mille kaudu GPCR-d indutseerivad signaalradu (Wootten *et al.* 2018).

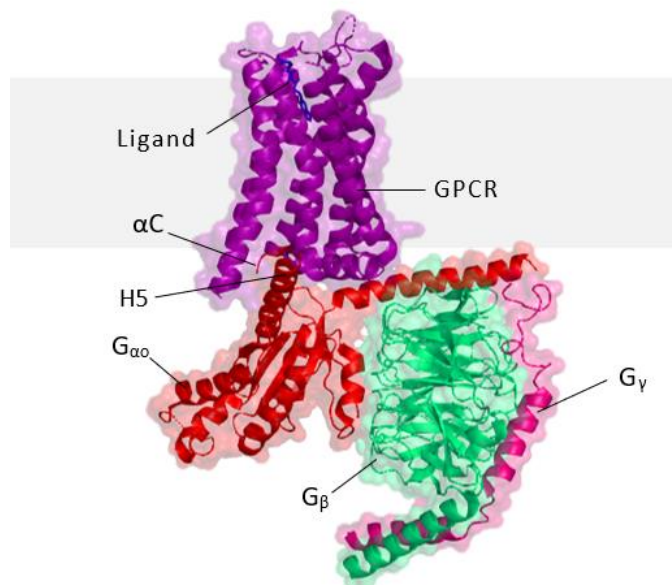
3.1.2 G-valgud ja nende roll signaaliülekandes

Guaniinnukleotiidi siduvad regulaatorvalgud ehk G-valgud asuvad plasmamembraani läheduses, ning osalevad rakus mitmete funktsioonide regulatsioonis, sealhulgas membraani vesikulaarne transport, valgusüntees, raku kasvamine ja tsütoskeleti arenemine. Imetajate G-valgud saab jagada väikesteks monomeerseteks ja heterotrimeerseteks G-valkudeks, millel on keskne roll signaaliülekandes (Brady *et al.* 2012).

Heterotrimeersed G-valgud koosnevad $G\alpha$, $G\beta$ ja $G\gamma$ allühikust. Inimese organismis esineb 21 erinevat $G\alpha$ allühikut, kodeeritud 16 geeni poolt, mis erinevad alternatiivse splaissingu tulemusel; 6 $G\beta$; ja 12 $G\gamma$ allühikut. Allühikud $G\beta$ ja $G\gamma$ esinevad alati dimeerina ($G\beta\gamma$). $G\beta\gamma$ allühikul on regulatoorne funktsioon ja osaleb signaaliülekandes, olles näiteks ionkanalite modulaator. $G\alpha$ allühik vastutab mitmete efektormolekulide regulatsiooni eest, seob guaniinnukleotiidi (GDP, guanosiindifosfaat; GTP, guanosintrifosfaat) ja omab GTP-aasset aktiivsust (Lodish *et al.* 2016).

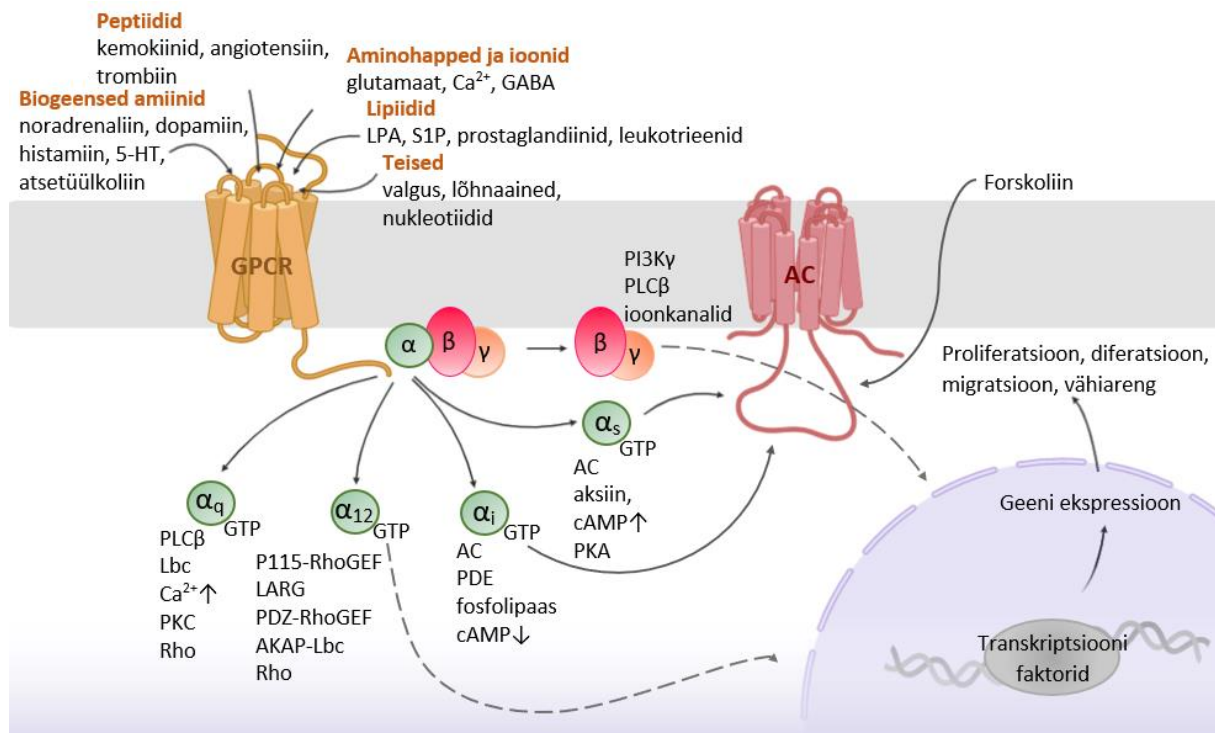
G-valgud esinevad GDP-d siduvad inaktiivses heterotrimeerses kompleksis ja GTP-d siduvas aktiivses konformatsioonis. GDP-GTP vahetus on vahendatud guaniinnukleotiidi vahetusfaktori (GEF) poolt. Levinud vaate kohaselt on G-valkude aktivatsioon põhjustatud aktiveeritud olekus GPCR-le seondumisest, mis toob kaasa C-terminaali läheduses asuva H5 heeliksi (joonis 1) pikenemise, mis viib GDP vabanemiseni G-valgu kompleksist (Flock *et al.* 2015). GTP sidumine, mis on võimalik tänu GTP kõrgele kontsentratsioonile rakus võrreldes GDP-ga, põhjustab konformatsioonilise muutuse, mis võimaldab $G\alpha$ allühikul vabaneda heterotrimeerses kompleksist, GPCR-st ja reguleerida efektormolekule. G-valkude inaktivatsioon on reguleeritud GTP hüdrolyüsi kiirusega (Lodish *et al.* 2016). Signaali peatamisel on oluline roll ka arrestiinidel, adaptervalgud, mis seonduvad membraansete

retseptoritega, reguleerides nende aktiivsust. β -arrestiinid, mis seonduvad GPCR-le tuimestavad (retseptori, takistades G-valkude seondumist retseptoriga ja võivad põhjustada GPCR sissetõmbe (*internalization*) (Smith and Rajagopal 2016).



Joonis 1. Aktiveeritud GPCR ja G-valgu kompleks. Joonisel on toodud ligandiga seostunud aktiveeritud serotoniini 5-HT1B retseptor, mis on moodustanud G-valguga kompleksi (G_o allühikuga). Erinevate värvustega on tähistatud GPCR, $G\alpha$, $G\beta$ ja $G\gamma$. $G\alpha$ allühiku C-terminaal (αC) on oluline interaktsiooni piirkond GPCR-ga seostumisel ja selle läheduses asuva H5 heeliksi konformatsiooni muutus on vajalik GDP dissotsiatsiooniks. Joonis on tehtud kasutades PyMOL 2.4.0 programmi, valgu struktuur PDB formaadis on võetud andmebaasist (García-Nafría *et al.* 2018).

$G\alpha$ allühikud jagatakse funktsiooni ja järjestuse homoloogia alusel nelja perekonda: G_s perekond (sisaldab G_s , G_{olf}) stimuleerib adenülaadi tsüklaasi; G_i perekonda (G_{i1-3} , G_o , G_t , G_z) kuuluv G_i näiteks inhibeerib adenülaadi tsüklaasi; G_q perekonda (G_q , G_{11} , G_{14} , G_{15}) kuuluv G_q näiteks aktiveerib ensüümi fosfoinositiidfosfolipaas C (PI-PLC); ja G_{12} perekonda (G_{12} , G_{13}) kuuluv G_{12} näiteks aktiveerib Rho-GEF-i (Brady *et al.* 2012) (joonis 2 ja 3a). $G\alpha$ allühikud vastutavad veel mitmete teiste efektormolekulide regulatsiooni eest. Effektormolekulide vahendusel tekib rakuline vastus (nt Ca^{2+} ionide ja tsüklilise adenosinmonofosfaadi (cAMP) taseme tõus) erinevate signaalradade aktiveerimisel, mille mõõtmiseks on välja arendatud mitmeid meetodeid, mille signaalid pole omavahel võrreldavad.



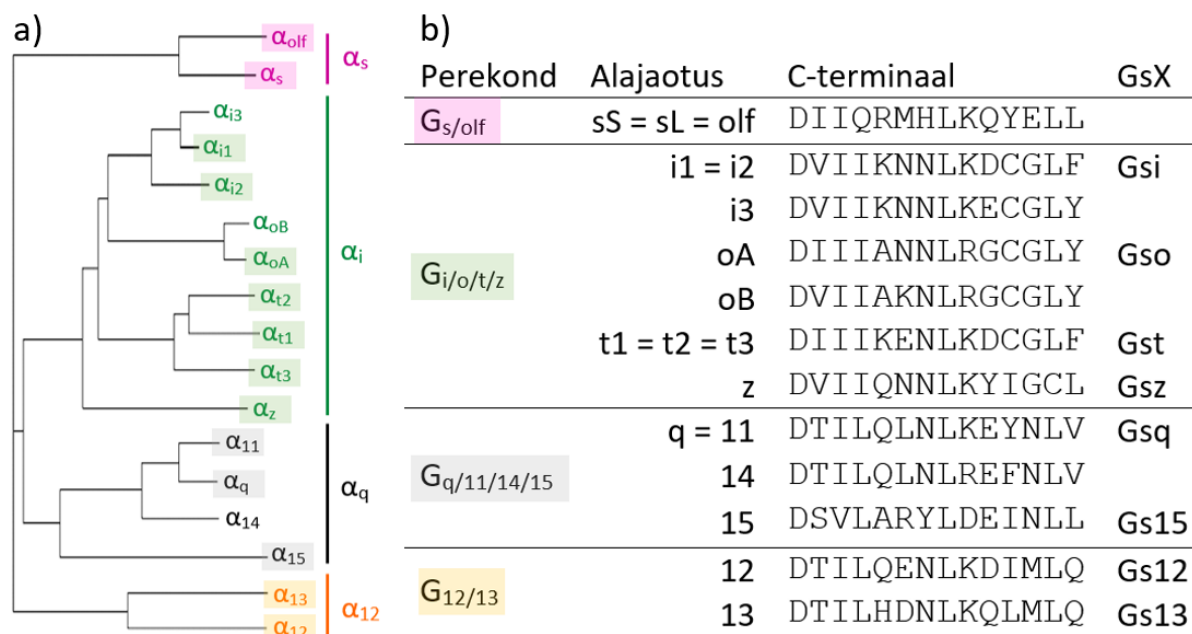
Joonis 2. Ülevaade erinevatest G-valkude poolt reguleeritud signaaliradadest. Joonis on kohandatud artiklist (Dorsam and Gutkind 2007).

Üks GPCR saab aktiveerida mitu erinevat $G\alpha$ allühikut, mis enamasti kuuluvad ühte, aga võivad kuuluda ka erinevatesse perekondadesse. Osade perekondade, nagu G_i , alla kuuluvad $G\alpha$ allühikud on selektiivsemad GPCR-ga seondumisel (Okashah *et al.* 2019) samal ajal kui G_{15} allühik saab olla seotud retseptoritega, mis on seotud nii G_i kui ka G_s perekonnaga (Giannone *et al.* 2010). See tähendab, et kui mõõta ühte kindlat rakulist vastust, ei ole sageli võimalik eristada erinevaid $G\alpha$ allühikuid, mis selle indutseerisid.

3.1.3 Modifitseeritud G-valgud

Et ületada GPCR-de reguleeritud signaalradade uurimisega seotud probleeme, on üheks võimaluseks konstrueerida G-valkude C-terminalised kimäärid. Kimäärsetel G-valkudel on $G\alpha$ allühiku C-terminalis muudetud lühike valguline järjestus, mis on oluline $G\alpha$ /GPCR interaktsioonide piirkond ja on erinev $G\alpha$ allühikutel. G-valgu allühiku $G\alpha$ põhiosa (*core*) vastutab kindla signaaliülekanne raja aktiveerimise eest. Ekspresseerides kimäärseid G-valke rakus, on võimalik signaalradu ümber suunata. Varasemad kimäärseid G-valgud, mille $G\alpha$ põhiosa pärines G_q allühikust, olid suunatud kaltsiumi taseme tõusule rakus (Coward *et al.* 1999). Ballisteri töörühmas loodud kaheksa G_s valgu kimääri (G_sX) omavad C-terminalis spetsiifilist 14 aminohappelist järjestust (joonis 3), mis aktiveerudes stimuleerivad adenülaadi tsüklaasi, mis katalüüsib adenosiin-5'-trifosfaadist (ATP) cAMP-i. See võimaldab cAMP-i

taseme järgi võrrelda erinevate GPCR-de aktivatsiooni, mis ei ole tingimata seostunud G_s allühikuga. Konstruktides G_{si} , G_{so} ja G_{st} on -4 positsioonis tsüsteiin asendatud seriiniga, mis muudab neid pertussis-toksiini suhtes mittetundlikuks. (Ballister *et al.* 2018).



Joonis 3. Inimese G-valkude fülogeneesipuu ja kimäärsete $G\alpha$ allühikute muudetud 14 aminohappelised järjestused C-terminaalis. (a) Kui võrrelda tabelit fülogeneesipuuga, on näha, G_{sX} konstruktid hõlmavad suure osa perekondadest (märgitud värvilise kastiga), mis võimaldab uurida suurt osa GPCR-te spektrist. Joonis on kohandatud artiklist (Nehmé *et al.* 2017). (a) Modifitseeritud järjestused on grupeeritud $G\alpha$ perekondadesse. Alajaotused, mis omavad C-terminaalis samasugust järjestust, on sisse kantud ühekordselt. G_{sX} tulbas on märgitud sellele järjestusele vastav konstrukti (Ballister *et al.* 2018).

Uuemad katsed kimäärsete G-valkudega on näidanud, et kuigi $G\alpha$ C-terminaal on oluline interaktsiooni tekkeks GPCR-ga, ei taga see täielikku selektiivsust $G\alpha$ allühiku suhtes. Osadel retseptoritel, nagu histamiini H1 (H_1R) ja endoteliini retseptor ($ET_A R$), määrab $G\alpha$ selektiivsuse ainult C-terminaali järjestus. Histamiini H2 retseptoril ($H_2 R$) on selektiivsus määratud C-terminaali kui ka $G\alpha$ põhiosa järjestuse poolt, samas kui dopamiini D1 ($D_1 R$) ja muskariini M3 ($M_3 R$) retseptoritel on selektiivsus määratud ainult $G\alpha$ põhiosa poolt (Okashah *et al.* 2019). Sellel põhjusel tuleb G_{sX} konstruktidega tehtud katsete tõlgendamisel läheneda ettevaatlikusega.

3.2 Sissejuhatus metoodikatesse

3.2.1 cAMP-i määramise meetodid

Varasemad cAMP-i määramise meetodid põhinesid radiomärgistusega cAMP-i ja ligandi indutseeritud endogeense cAMP-i konkureerival sidumisel cAMP-i siduval valgule, mis hiljem osutus olema PKA (proteiinkinaas A) (Gilman 1970). Samal põhimõttel on loodud ka cAMP-i siduval antikehal põhinev meetod (RIA, *radioimmunoassay*) (Daniels *et al.* 1994). Teise lähenemisega on tsükliliste nukleotiidide reguleeritud ioonkanalitel (CNGC) põhinevad meetodid, mis mõõdavad Ca^{2+} ionide sissevoolu pärast ioonkanali aktiveerimist cAMP-i poolt. Antud meetodid kas ei võimalda jälgida cAMP-i taseme dünaamilisi muutusi ajas, nõuavad keerukat aparatuuri või ei ole piisavalt selektiivsed (Sprenger and Nikolaev 2013). Uuemad optilised meetodid, mis põhinevad Försteri resonantsenergia ülekandel (FRET), võimaldavad seda.

FRET on mittekiirguslik energia ülekanne välise valgusallikaga ergastatud doonorfluorofoorilt aktseptorfluorofoorile, mis üldjuhul on fluorestseeruvad valgud. FRET-i toimumiseks on vajalik fluorofooride lähedus (kuni 10 nm), fluorofooride dipoolide orientatsioonid, mis soodustavad ülekannet ja doonori kiirgus- ning aktseptori ergastusspektri piisav kattumine. Energia ülekande efektiivsus (E) väljendub valemiga:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6}$$

(valem 1)

millest järeldub, et ülekande efektiivsus on väga tundlik fluorofooride omavahelise kauguse (r) suhtes. Försteri raadius (R_0) ehk vahekaugus, kus ülekanne on pool maksimaalsest, sõltub fluorofooride dipoolsest orientatsioonist ja doonori kiirgus- ning aktseptori ergastusspektri kattumisest (Lakowicz 2006). FRET-il põhinevad biosensorid tuginevad energia ülekande efektiivsuse muutusel cAMP-i seostumisel. Esineb kaks levinud viisi, kuidas muutusi efektiivsuses esitada: doonori ja aktseptori fluorestsentsi intensiivsuse suhtena (sensitized emission, SE) ja doonori fluorestsentsi eluea kaudu (fluorescence lifetime imaging, FL). SE meetodis ergastatakse doonorit sobival lainepikkusel ja FRET-i efektiivsus väljendub doonori ja aktseptori kiirguse intensiivsuse suhtena. FL sõltub ainult doonori signaalist ja ülekande efektiivsus saadakse doonori emissiooni eluea muutusest (Van der Krogt *et al.* 2008).

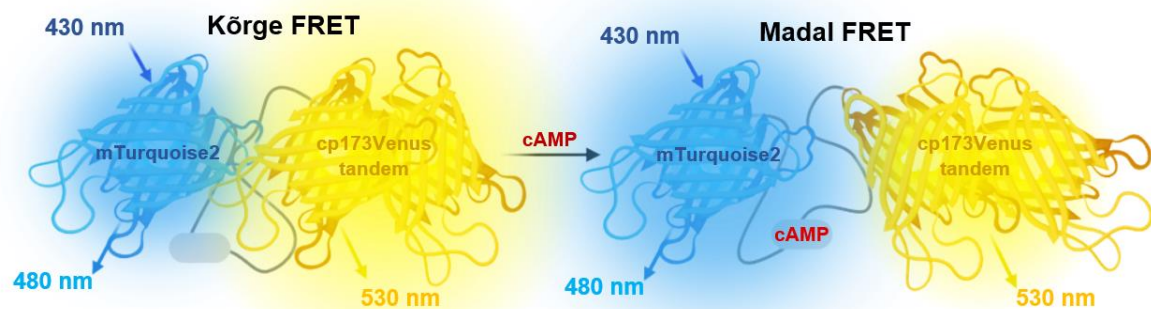
Esimesed FRET-i efektiivsusel põhinevad meetodid cAMP-i määramiseks baseerusid PKA (proteiin kinnas A) dissotsiatsioonil mille allühikud on keemiliselt märgistatud vastavalt rodamiini (aktseptor) ja fluorestsiniiga (doonor). cAMP-i puudumisel on moodustunud tetrameerne kompleks ja FRET-i efektiivsus on kõrge. Nelja cAMP-i molekuli seostumisel vabanevad katalüütilised allühikud ja FRET-i efektiivsus väheneb. Sensoril esines mitu puudust: tetrameeri moodustumiseks peavad allühikud olema võrdeliselt ekspresseeritud rakus, märgistatud allühikud võivad interakteeruda vabade endogeensete looduslike allühikutega ja nelja cAMP-i molekuli kooperatiivne seostumine sensori dissotsiatsiooniks raskendab andmete analüüsi. Selleks, et muuta biosensori mehhanismi lihtsamaks, on kasutusele võetud lühemad valgu järjestused, millele seostub cAMP, mis pärinevad näiteks PKA-st või CNGC ioonkanalitest (Sprenger and Nikolaev 2013). Uuemates FRET biosensorites on rohkem kasutust leidnud Epac valk (cAMP efektorvalk).

3.2.1.1 Epac valgul põhinevad FRET biosensorid

Eelnimetatud puuduste vältimiseks, mis esinesid PKA-l põhinevatel biosensoritel, arendati välja lihtsamad Epac valgul põhinevad biosensorid. cAMP-i poolt reguleeritud vahetusfaktor Epac valk esineb kahe isovormina – Epac1 ja Epac2, mis vastavalt omavad ühte või kahte cAMP-i sidumisdomeeni, millest tuleneb ka Epac2 suurem afiinsus cAMP-le. Biosensorite arendamisel on kasutatud Epac valgu cAMP-i siduvaid domeene üksikult (Nikolaev *et al.* 2004) või kogu Epac valgu järjestust, mis on muudetud katalüütiliselt inaktiivseks (Ponsioen *et al.* 2004).

Varasemad Epac valgul põhinevad biosensorid koosnesid kollasest (*yellow fluorescent protein*, YFP, aktseptor) ja tsüano fluorestsentsvalgust (*cyan fluorescent protein*, CFP, doonor), mis olid omavahel seotud Epac valgu sidumisdomeeni polüpeptiidahelaga (joonis 4) (Ponsioen *et al.* 2004). Esialgsel CFP-YFP paaril oli mitmeid puudusi. CFP lai kiirgusspekter kattub osaliselt YFP omaga, mistõttu mõõdetud YFP intensiivsus on suurem ja ei tulene ainult FRET-st. YFP-i intensiivsus sõltub raku sisemisest pH muutusest, on UV-valguse tundlik ja esineb pöörduvat fotokromismi– valguse indutseeritud konformatsiooni muutus, mille tagajärel muutub aine ergastusspekter. Fluorofooride vahel võib esineda dimeriseerumine, mis ei võimalda fluorofooridel piisavalt kaugeneda cAMP-i seostumisel (Van der Krogt *et al.* 2008). Katsetades erinevaid fluorofooride paare, on arendatud välja paremate omadustega biosensoreid.

Neljanda generatsiooni biosensoris Epac-S^{H187} on CFP asendatud doonoriga mTurquoise2, mis on tunduvalt eredam ja fotostabiilsem ja võimaldab pikema aja jooksul mõõtmisi teostada. Doonori suurem eredus võimaldab rakke ergastada väiksema intensiivsusega, mis vähendab fototoksilisust. YFP on asendatud aktseptoriga cp173Venus tandem, mis ei ole väikeste pH muutuste suhtes nii tundlik. Lisaks punktmutatsioon Epac1 valgus (glutamiini asendus glutamaadiga), suurendab cAMP-i afiinsust 2,5 korda, mis sobib kasutamiseks rakkudes, kus cAMP-i tase ei ole väga kõrge (Klarenbeek *et al.* 2015).



Joonis 4. Epac-S^{H187} cAMP biosensori tööpõhimõte. Ergastades doonorit (mTurquoise2) lainepikkusel 430 nm olukorras, kus cAMP ei ole sensoriga seostunud, on FRET-i efektiivsus kõrge ja aktseptori (cp173Venus tandem) fluorestsentsi intensiivsus lainepikkusel 530 nm on suur. cAMP-i seostumisel muutub sensori konformatsioon, FRET-i efektiivsus on madal ja seetõttu domineerib doonori kiirgus lainepikkusel 480 nm.

3.2.2 BacMam tehnoloogia

Erinevate valkude uurimiseks rakus on vaja, et uuritavas rakuliinis ekspresseeritaks neid valke. Geen viiakse rakku rekombinantse desoksüribonukleiinhappe (DNA) kujul, kus geeni kandjaks võivad olla bakteriaalse päritoluga plasmiidid või viiruslikud vektorid. Võõr-DNA viimiseks eukariootsesse rakku on välja arendatud mitmeid meetodeid, neist levinuimad on lipofiilsed reagentid, elektroporatsioon, geenipüss, biolistiline transformatsioon jt (Brown 2010).

Käesolevas töös valiti transfektsiooniks BacMam süsteem, mis kasutab geeni ülekandeks imetajarakkudesse modifitseeritud putukaviirust – bakuloviirust. Enim uuritud ja kasutust leidnud on *Autographa californica* multikapsiidne nukleopolühedroviirus (AcMNPV). AcMNPV sisaldab kaheaheelalist tsirkulaarset 130 kb (kiloaluspaari) suurust bakuloviiruse genoomi. Bakuloviirused on võimelised paljunema ainult putukarakkudes, üks laialdaselt

levinud putukarakuliine nende paljundamiseks on *Spodoptera frugiperda* putuka munasarjast eraldatud Sf9 rakuliin. Bakuloviirused on võimelised sisenema imetajarakku, aga mitte neis paljunema, mis teeb nende käsitlemise ohutuks (Bioohutus tase 1). Geeni avaldumiseks imetajarakkudes peab soovitud geen asuma imetajarakkude poolt äratuntavat promootori allspetsiifiline DNA järjestus, kust algab transkriptsioon. Ekspressiooni taseme kontrollimiseks imetajarakus on võimalik varieerida viiruse kogust ja lisada kemikaale, nagu naatriumbutüraat, mis on deatsetülaasi mittespetsiifiline inhibiitor, mis muudab DNA transkriptsiooni jaoks avatumaks (Kost and Condreay 2002).

Rekombinantne bakuloviirus võib sisaldada ja on võimeline stabiilselt ekspresseerima kuni 38 kb suurust sisestust. Korruga on võimalik rakku viia mitu geeni erinevate bakuloviirustega ja meetod on rakendatav paljudele imetaja rakuliinidele. Üldjuhul kasutatakse BacMam süsteemi lühiajaliseks transfektsiooniks, mis tähendab, et sisseviidud DNA raku genoomi ei integreeru ja püsivat rakuliini ei teki. Lisaks võimaldab BacMam tehnoloogia kõrget reguleeritava transfektsiooni taset, ei ole toksiline rakkudele ja on ohutu inimestele ja keskkonnale (Kost and Condreay 2002)

3.2.3 Bakuloviiruste tiitri määramine

On oluline, et imetajarakkudes oleks erinevates katsetes korratav ja optimaalne valgu ekspressioonitase. Ekspressioonitaset mõjutavad faktorid nagu infektsiooniaeg ja rakkude arv nakatamise alghetkel, aga kriitilisema tähtsusega on viirusosakeste osakaal rakkude suhtes (MOI, *multiplicity of infection*). MOI arvutamiseks katses on vajalik määrata nakatamisvõimeliste viirusosakeste kontsentratsioon ehk tiiter. Ebatäpselt hinnatud viiruse tiiter põhjustab liiga madalat või kõrget MOI-d katses, mis mõlemal juhul vähendab valgu ekspressiooni ja ei võimalda katsetingimusi reprodutseerida (Roldão *et al.* 2009).

Erinevad viiruse tiitri määramise meetodid – reaalaaja Q-PCR, naastude analüüs, TCID₅₀ analüüs jt, nõuavad spetsiaalset aparatuuri, või on töö- ja ajamahukad. Meetodid annavad läbilõikes mõnevõrra erinevaid tulemusi, aga meetodi siseselt on piisavalt täpsed. Raku diameetri muutusel põhinev meetod, on ajakulu ja töömahukuse poolest üks parimaid (Roldão *et al.* 2009). Meetod põhineb nähtusel, et bakuloviirusega nakatunud Sf9 putukarakud ei jagune pärast nakatumist ja 24 tundi pärast esmast nakatumist on rakkude diameeter suurenenud ligikaudu 20–40%. Mida rohkem on lahuses viiruseosakesi, seda suurem on keskmine raku diameeter. Vastavast seosest on võimalik leida viiruse kontsentratsiooni. Mõõtmisvea vähendamiseks, mis tuleneb diameetri suurenemisest teistkordsel nakatumisel, mõõdetakse

raku diameetrit 24 tundi pärast nakatumist. Sellel ajahetkel on diameetri suurenemine põhjustatud põhiliselt esmakordsest nakatumisest (Janakiraman et al. 2006). Käesolevas töös on rakkude diameeter määratud pildianalüüsil kasutades ICSE-tööriista (pildianalüüsil põhinev raku suuruse hindamine; Image-based cell size estimation), mis on välja arendatud Tartu Ülikooli Bioorgaanilise keemia õppetooli töörühmas (Laasfeld et al. 2017).

4 EKSPERIMENTAALNE OSA

4.1 Materjalid ja aparatuur

Kimäärsete G-valkude (Gsi, Gso, Gst, Gsz, Gs12, Gs13, Gs15, Gsq) ja metsiktüüpi Gs geeni sisaldav pEM705 plasmiidid telliti *E.coli* (*Escherichia coli*) tüve DH5 α rakkudes Addgene'st (Robert Lucas Lab). Plasmiidide ja bakmiidide paljundamiseks kasutati vastavalt RbCl kompetentseid *E.coli* tüve DH5 α (NEB) ja DH10Bac rakke (Invitrogen). Selektiooniplaatide tegemiseks on kasutatud söödet L-Broth (AppliChem), agarooši (Sigma), IPTG-d (Fermentas), X-gal-i (Thermo Scientific) ja antibiootikume ampitsilliin (AppliChem), kanamütsiin (Gibco), tetratsükliin (Sigma), gentamütsiin (MP Biomedicals). Bakterite transformeerimisel on kasutatud SOC meediumit (2% trüpton (Lab M), 0,5% pärmiekstrakt (Lab M), 10 mM NaCl (AppliChem), 2,5 mM KCl (AppliChem), 10 mM MgCl₂ (AppliChem), 10 mM MgSO₄ (AppliChem), 20 mM glükoos (KEBO)) Bakmiidide ja rekombinantse DNA puhastamisel on kasutatud Midiprep Kit-i (Favorgen) ja GeneJET Plasmid Miniprep Kit-i (Thermo Scientific). Plasmiidide ja bakmiidide kontsentratsioonid ja puhtuse aste määrati Thermo Scientific NanoDrop 1000 spektromeetril lainepikkustel 260 ja 280 nm. Plasmiidide lõikamiseks valiti restriктаasid NotI (FastDigest) (Thermo Scientific), EcI136II (FastDigest) (Thermo Scientific) ja Eco105I (Thermo Scientific). Ligeerimisel kasutati T4 DNA ligaasi komplekti (Thermo Scientific). Geelelektroforeeside tegemisel on kasutatud agarooši (Sigma), Tris-atsetaat-EDTA (TAE) puhvrit (1 mM EDTA (Merck), 40 mM Tris (Sigma), pH 8,3 saavutati 30% äädikhappe (Lachner) lisamisega), etiidiumbromiidi (10 mg/ml), 6X TriTrack laadimisvärvi (Thermo Scientific) ja GeneRuler 1 kb DNA massiredelit (Thermo Scientific). Kõik geelelektroforeesid teostati kasutades Sub-Cell GT süsteemi (Bio-Rad). DNA puhastamiseks geelist on kasutatud Silica Bead DNA Gel Extraction Kit-i (Thermo Scientific).

Praimerite disain ja plasmiidide konstrueerimine teostati tarkvara Genome Compiler abil. Rekombinantse plasmidi PCR analüüsil kasutati DreamTaq DNA polümeraasi komplekti (Thermo Scientific) ja primereid CAG_promoter_forw (5' CTGGTTATTGTGCTGTCTC 3') (eritellimusel, Integrated DNA Technologies), pFastBac1_Rev (5' GTATGGCTGATTATGATCCTC 3') (eritellimusel, Integrated DNA Technologies). Kõik PCR-i reaktsioonid teostati termotsükleris Mastercycler Gradient (Eppendorf). Rekombinantsete plasmiidide sekveneerimised on teostatud Tartu Ülikooli Genoomika Instituudi tuumiklaboris.

Bakuloviiruste tootmiseks kasutati liblikalise *Spodoptera frugiperda* munasarjakoest pärit Sf9 rakuliini (Invitrogen), transfektsiooni reagenti TurboFect (Thermo Scientific) seerumivaba rakusöödet EX-CELL 420 (Sigma). Rakkude arv ja elusrakkude osakaal määrati 0,4% trüpaansinisega (Sigma) ja rakke loendati Bio-Rad TC10™ Automated Cell Counter-l. Viiruste filtreerimiseks kasutati 0,45 µm poori suurusega SFCA (pindaktiivsete ainete vaba tselluloosatsetaati) filtrit (VWR). Bakuloviiruste kontsentratsioon määrati raku diameetri muutusel põhineva meetodiga BioTek Cytation™ 5 plaadilugejaga.

Epac-S^{H187} sensorvalku kodeeriva viiruse on genereerinud Maris-Johanna Tahk. Töös kasutatud viiruseid ekspresseeriti CHO-K1-OX1 (oreksiin-1 retseptorit ekspresseeriv Hiina hamstri munasarja rakud) rakuliinis (saadud professor Jyrki Kukkoneni töörühmast, Helsinki Ülikool, Soome) ja U2OS (inimese osteosarkoomi rakud) rakuliinis (DSMZ). CHO-K1-OX1 rakuliini kasvatamiseks kasutati rakusöödet DMEM/Nutrient Mixture F-12 Ham (Sigma) (+10% FBS (Gibco) + streptomütsiin 0,1 mg/ml (PAA) + penitsilliin 100 U/ml (PAA) + genetitsiin 0,4 mg/ml (PAA)) ja U2OS rakke kasvatati söötmes McCoy's 5A (Sigma) (+ L-glutamiin (Sigma) + 10% FBS (Gibco) + streptomütsiin 0,1 mg/ml (PAA) + penitsilliin 100 U/ml (PAA)). Rakke kasvatati polülüsiiniga kaetud 6-süvendilistel rakukasvatusplaatidel (Nunc). Rakkude lahtivõtmiseks kasutati 0,05% trüpsiini-EDTA (Sigma) lahust. Rakkude infekteerimisega sisaldas naatriumbutüraati (0,01 M) (Sigma). Rakukultuuri rutiinseteks vaatlusteks kasutati Olympus CKX31 mikroskoopi.

Katsed ligandide mõju uurimiseks Epac-S^{H187} sensorvalku ja kimäärseid G-valke ekspresseerivates CHO-K1-OX1 ja U2OS rakkudes teostati plaadilugejaga PHERAstar (BMG Labtech) 96-süvendilises läbipaistva lameda põhjaga mustas rakukasvatusplaadis (Corning). Kõik mõõtmised teostati fosfaatpuhverdatud soolalahuses (DPBS), mis sisaldas Ca²⁺ ja Mg²⁺ ioone (Corning). Töös kasutatud ligandid: forskoliin (Tocris), dopamiin (Sigma), noradrenaliin (Sigma), apomorfiin (Tocris), IBMX (Tocris), karbakoliin (Tocris), atsetüülkoliin (Sigma), NECA (Tocris). Ligandide varulahuste valmistamisel vastavalt vajadusele on kasutatud DMSO-d (AppliChem) või Milli-Q vett (Millipore Milli-Q, 18 MΩ/cm).

4.2 GsX konstrukti kodeeriva bakuloviiruse loomine

4.2.1 pFastBac™1_GsX plasmiidide konstrueerimine

Kõik kimäärsete G-valkude geene sisaldavad *E.coli* DH5α rakud kanti selektsiooniplaadile (2% agar LB söötmes, ampitsilliin 50 µg/ml). Plaat inkubeeriti 24 tundi 37 °C juures. Plaadilt eraldati kolooniad ja kasvatati LB söötmes (ampitsilliin 50 µg/ml) 37 °C

juures 16-24 tunniks. Bakterid tsentrifuugiti (14 000 g, 1 min), lüüsi ja plasmiidid puhastati lüsaadist Favorgen Midiprep Kit-ga vastavalt tootja protokollile.

Rekombinantse plasmidi (pFastBac1_GsX) saamiseks lõigati pFastBac1 plasmiid (retsipient) restriktasidga vastavalt tootja protokollidele FD NotI ja FD Eco105I ja defosforüleeriti FastAP fosfataasiga. Puhastatud pEM705_GsX plasmiidide (doonor) lõikamiseks kasutati restriktase FD NotI (1 µl) ja FD Ecl136II (1 µl) vastavalt tootja protokollile. Antud restriktasid lõikesaidid on doonor- ja retsipientplasmidis unikaalsed (lisa 1 ja 2). Inkubeeriti 37 °C juures 1 tund ja kõik ensüümid inaktiveeriti 5 min 80 °C juures.

Restriksiooni produktide kontrolliks ja vajalike fragmentide eraldamiseks teostati geelelektroforees. Vastavalt fragmentide suurusele valmistati 1,2% agarosgeel Tris-atsetaat-EDTA (TAE) puhvris. Puhvri ja agarosi segu kuumutati agarosi täieliku lahustumiseni, lasti jahtuda ligikaudu 40 °C-ni ja lisati etiidiumbromiid (0,01% geeli ruumalast), geelil lasti tarduda 15–30 minutit. Proovid segati 6X TriTrack laadimisvärviga suhtes 5:1. Geelelektroforeesid viidi läbi pingel 60 V. Vöotide visualiseerimiseks valgustati geeli UV-valgusega lainepikkusel 254 nm. Erinevate DNA fragmentide suurused määrati GeneRuler 1 kb DNA massiredeli abil. Õige suurusega DNA fragmendid puhastati geelist kasutades Silica Bead DNA Gel Extraction Kit-i. Fragmentide ligeerimiseks kasutati T4 ligaasi vastavalt tootja protokollile.

Rekombinantne plasmiid transformeeriti kompetentsetesse *E.coli* DH5α rakkudesse plasmidi paljundamise eesmärgil kuumašoki meetodil. -90 °C juures säilitatud DH5α rakud asetati jõesse sulama, iga transformatsiooni kohta võeti 70 µl bakterirakke. Rakkudele lisati 20 µl ligeerimisegu ja inkubeeriti 30 minutit jään. Kuumašokiks asetati rakud 30 sekundiks 42 °C vesivanni ja seejärel 5 minutiks jään. Segule lisati 250 µl toasooja SOC lahust ja inkubeeriti 37 °C juures horisontaalses asendis loksutamiskiirusega 250 rpm 6 tundi. Bakterirakke sisaldavat segu (80 µl) kanti selektsiooniplaadile (2% agaros LB söötmes, ampitsilliin 50 µg/ml). Plaat inkubeeriti 24 tundi 37 °C juures. Igalt plaadilt eraldati vähemalt kaks kolooniat ja pandi LB söötmesse (ampitsilliin 50 µg/ml) kasvama 37 °C juures 16-24 tunniks. Bakterid tsentrifuugiti (14 000 g, 1 min), lüüsi ja plasmiidide DNA-d puhastati lüsaadist Midiprep ja Miniprep Kit-ga vastavalt tootja protokollile. Rekombinantse plasmidi järjestuse kontrollimiseks teostati PCR reaktsioon, kasutades DreamTaq DNA polümeraasi (0,5 U) ja vastavaid praimereid CAG_promoter_forw (0,3 µM) ja pFastBac1_Rev praimerit (0,3 µM). Konstruktide suuruse määramiseks teostati geelelektroforees eespool kirjeldatud tingimustel.

4.2.2 Rekombinantsete bakmiidide genereerimine

Bakmiidi genereerimiseks transformeeriti rekombinantne plasmiid kompetentsetesse *E.coli* DH10Bac rakkudesse kuumašoki teel. Selleks pandi -90 °C juures säilitatud DH10Bac rakud jääle sulama, iga transformatsiooni kohta võeti 40 µl rakke. Rakkudele lisati ligikaudu 1 µg doonorplasmidi (pFastBac_GsX) ja inkubeeriti 30 minutit jääl. Kuumašokk teostati sarnaselt DH5α rakkudega (vt eespool). Bakterirakke sisaldavat segu, vastavalt 20 µl ja 100 µl, kanti kaheks jaotatud selektsiooniplaatidele (2% agaros LB söötmes, kanamütsiin 50 µg/ml, tetratsükliin 10 µg/ml, gentamütsiin 7 µg/ml, X-gal 100 µg/ml, IPTG 40 µg/ml). Plaat inkubeeriti 24 h 37 °C juures. Et eristada rekombinantse DNA-ga rakke teistest rakkudest, rakendati sini-valge selektsiooni. Valgete kolooniate kontrollimiseks valiti igalt plaadilt vähemalt kolm valget kolooniat ja kanti uuele sini-valge selektsiooniplaadile (vt eespool). Plaat inkubeeriti 24 tundi 37 °C juures. Plaadilt eraldatud kolooniad kasvatati LB-söötmes vastavate antibiootikumide juuresolekul (vt eespool) ja bakmiidid puhastati Midiprep Kit-ga vastavalt tootja protokollile.

4.2.3 Rekombinantsete bakuloviiruste tootmine Sf9 rakkudes

Sf9 rakkude transfektsiooniks kanti rakud 24 tundi enne tranfektsioonireagendi lisamist 6-süvendilisele plaadile kontsentratsiooniga 200 000 rakku/ml (0,6 mln rakku/süvend) seerumivabas EX-CELL 420 söötmes. Transfektsioon teostati vastavalt TurboFect-i tootja soovitatud protokollile. Rakke inkubeeriti temperatuuril 28 °C. Jälgiti nakatumismärke: rakkude diameetri suurenemine, elumus ja plaadi täituvus. Kolme kuni viie päeva pärast koguti P0 (tõstearv, *passage*) viirust sisaldav rakususpensioon 6-süvendilise plaadi süvendist. Viiruste amplifitseerimiseks ja P1 viiruste saamiseks 13–15 ml rakususpensioonile, milles oli 1,8–2 mln rakku/ml aktiivses kasvufaasis, lisati P0 viirus. Rakke inkubeeriti 28 °C juures pidevalt loksutades (120–150 rpm, vastavalt ruumalale). Kui rakkude elumus oli langenud ~30%-ni koguti P1 viiruse varulahused. Selleks tsentrifuugiti rakususpensiooni 10 minutit 1600 g juures ja pealiskihus filtreeriti läbi 0,45 µm filtri.

4.2.4 Bakuloviiruste kontsentratsiooni määramine

Viiruste tiitri ehk nakatusvõimeliste viirusosakeste kontsentratsiooni leidmiseks kasutati pildianalüüsil põhinevat rakkude suuruse hindamise (ICSE) meetodit (Laasfeld *et al.* 2017). Selleks kanti Sf9 rakud 24-süvendi plaadile EX-CELL 420 söötmes (0,2 mln rakku/süvend). Rakkude kinnitumiseks inkubeeriti plaati pool tundi. Valmistati 11 viiruse 3-kordset lahjendust ja üks tühiproov, mis sisaldas ainult söödet. Viiruse lahjendused kanti

rakkudele duplikaatidena ja inkubeeriti 24 tundi 28 °C juures. Igast süvendist tehti 4 pilti kasutades Cytation™ 5 plaadilugejat ja raku diameetri arvutamiseks kasutati Apareciumi tarkvara ICSE tööriista. Koostati eksperimentaalandmete graafik, raku diameetri sõltuvus viiruse kontsentratsioonist, ning EC₅₀ väärtuse leidmiseks teostati regressiooni analüüs, lähtudes mudelist valem 2. EC₅₀ on seotud viiruse kontsentratsiooniga vastava valemiga

$$c = \frac{N}{2 \cdot EC_{50} \cdot V}$$

(valem 2)

kus c on viiruse kontsentratsioon ühikutes ivp/ml (nakatusvõimeliste viirusosakeste arv/ml), N on rakkude arv süvendis nakatamise alghetkel, V on lahusti ruumala süvendis ja EC₅₀ väärtus on pool maksimaalsest efektiivsest viirusosakeste kontsentratsioonist (Laasfeld *et al.* 2017).

4.3 Biosensorit kodeeriva viirusega CHO-K1-OX1 rakkude nakatamine

Optimaalse biosensori taseme leidmiseks rakus teostati katse, kus varieeriti Epac-S^{H187} biosensorit ekspresseeriva bakuloviiruse ruumala. CHO-K1-OX1 rakud pandi vastavas söötmes kasvama 6-süvendilisele plaadile kuni saavutati täituvus 80–90%. Rakkudele kanti H187 viiruse suspensioonid naatriumbutüraadi juuresolekul (0,01 M) (ruumala kokku 2 ml), milles viiruse MOI varieerus 0-50. Rakke infekteeriti 8 tundi 37 °C juures. Pärast seda infekteerimisega eemaldati, loputati DPBS puhvriga, rakud võeti 0,05% trüpsiin-EDTA lahusega plaadilt lahti ja 100 µL rakususpensiooni kanti vastava söötmega mustale läbipaistva põhjaga 96-süvendilisele rakukultuuri plaadile. Plaati inkubeeriti üleöö 37 °C juures. Pool tundi enne mõõtmist eemaldati sööde ja loputati DPBS puhvriga. Igasse süvendisse lisati 90 µL DPBS puhvrit. Mõõtmised teostati PHERAstar (BMG) plaadilugejaga fokaalkõrgusel 4,5 mm ja temperatuuril 30 °C. Rakke ergastati, kasutades optilisi filtreid, lainepikkusel 427 ja intensiivsusi mõõdeti kanalites 530 nm ja 480 nm (täpsusega ± 10 nm). Enne forskoliini lisamist teostati 6 mõõtmistsükli, mida kasutati taustakorrektuuriks, ja seejärel lisati 10 µL forskoliini lahjendusi (kontsentratsioonivahemik 100–0,0064 µM).

Tulemuste analüüsil ja graafilisel esitamisel kasutati andmetöötlusprogrammi GraphPad Prism™ 5.0. FRET-i efektiivsus arvutati vastava valemiga:

$$\Delta FRET = \frac{\frac{I_{t=0}^{530\text{ nm}}}{I_{t=0}^{480\text{ nm}}} - \frac{I^{530\text{ nm}}}{I^{480\text{ nm}}}}{\frac{I_{t=0}^{530\text{ nm}}}{I_{t=0}^{480\text{ nm}}}}$$

(valem 3)

kus $I_{t=0}^{530\text{ nm}}$ ja $I_{t=0}^{480\text{ nm}}$ on intensiivsused vastavalt kollases ja sinises kanalis enne ligandide lisamist. $I^{530\text{ nm}}$ ja $I^{480\text{ nm}}$ on intensiivsused vastavates kanalites kindlal ajahetkel. Foskoliini EC₅₀ väärtuse leidmiseks teostati kolme parameetriline logistiline regressioon.

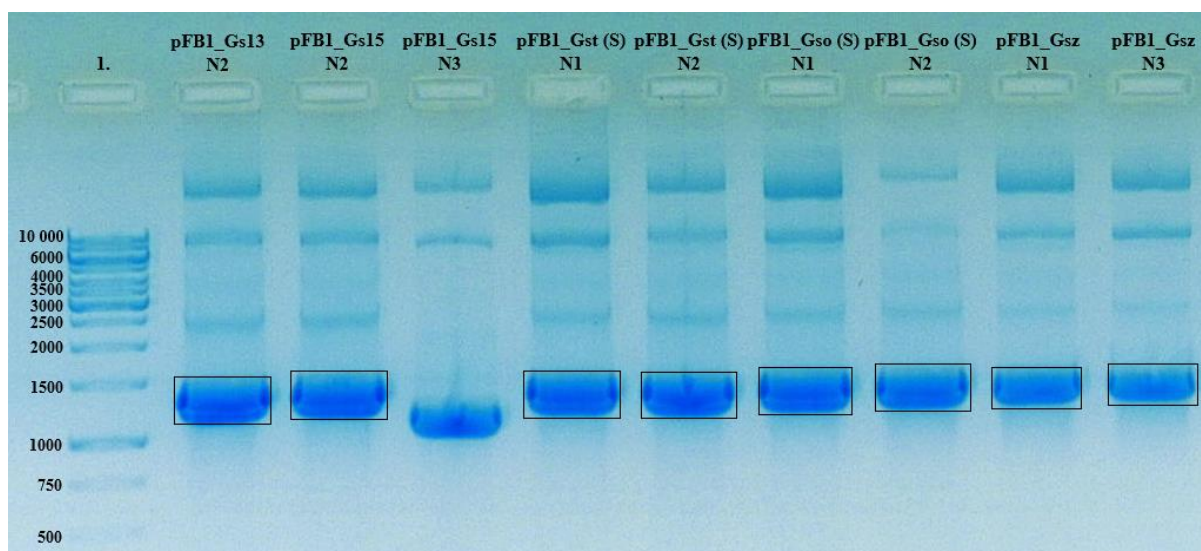
4.4 Seostumiskatsed imetajarakkudes

Imetajarakud kanti 6-süvendilisele plaadile kasvamiseks kuni täituvus oli 80–90%. Rakuliine CHO-K1-OX1 ja U2OS kasvatati sobivas söötmes. Rakkudele kanti infekteerimis segu (2 ml), mis sisaldas naatriumbutüraati (0,01 M), H187 P3 viirust (MOI ligikaudu 20), kimäärset G-valku kodeerivat viirust (10–500 µL) ja vastavat söödet mahuni. Rakke inkubeeriti 30 °C või 37 °C juures üleöö (optimaalne 16 h). Eelpool kirjeldatud viisil kanti rakud 96-süvendilisele plaadile ja valmistati mõõtmiseks ette. Mõõtmisi teostati varasemalt mainitud lainepikkustel enne ligandide lisamist 6 tsüklit ja seejärel lisati kolmandal minutil 10 µL ligandi lahjendust. Andmete töötlus ja FRET-i efektiivsuse arvutamine on kirjeldatud eelmises alapeatükis.

5 TULEMUSED JA ARUTELU

5.1 Kimäärseid G-valke kodeeriva BacMam süsteemi loomine

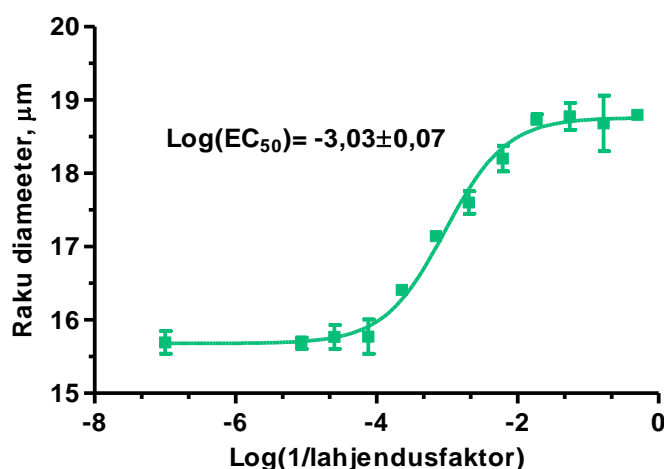
Kloneerimise tulemusel saadud pFastBac1_GsX plasmiidide kontrollimiseks teostati koloonia polümeraas ahelreaktsioon (*colony* PCR), kus praimerid CAG_promoter_forw ja pFastBac1_Rev olid valitud selliselt, et esimese praimeri seondumiskoht jääb soovitud geeni järjestusele ja teise praimeri seondumiskoht asub pFastBac1 vektori järjestusel. Õige konstrukti korral on PCR-i produkti suurus ~1400 aluspaari, tühi pFastBac1 plasmiid produkti ei anna. PCR produktide suurusi kontrolliti geelelektroforeesil. Eeldatud suurusega PCR produktid, mis langevad kokku teoreetilise suurusega, andsid pildil kastiga ümbritsetud kolooniad, millest saab järeldada, et plasmiid sisaldab soovitud geeni (joonis 5). PCR-analüüs oli teostatud kõikidele üheksale pFastBac1_GsX plasmiididele ja kõikidel oli leitud õige suurusega produkt (kõikide plasmiidide geelelektroforeesi tulemused näitamata). Kõik rekombinantsed plasmiidid saadeti sekveneerimisele, ning pärast valiti plasmiidid, mille kõik sekventsidsid olid õiged ja mutatsioonideta. Kontrollitud pFastBac1_GsX plasmiidid transformeeriti DH10Bac rakkudesse, millest puhastatud bakmiide kasutati bakuloviiruse genereerimiseks Sf9 rakkudes. Kokku on õnnestunud genereerida 9 viirust.



Joonis 5. Koloonia PCR praimeritega CAG_promoter_forw ja pFastBac1_Rev pFastBac1_GsX konstruktide kontrollimiseks. 1. süvend: DNA massiredel (GeneRuler 1 kb). Musta kastiga märgistatud kolooniad sisaldasid soovitud suurusega PCR produkti.

5.2 Bakuloviiruste kontsentratsiooni määramine

Selleks, et tagada edaspidistes katsetes ühtlased nakatamistingimused, oli vaja määrata viiruste kontsentratsioonid ehk tiitrid. Kasutades ICSE meetodit, on kokku määratud tiiter kaheksal GsX kodeerival viirusel ja H187 viirusel. Joonisel 6 esitatud graafik– raku diameetri sõltuvus viiruse kontsentratsioonist, on näide eksperimentaalandmete graafikust, millelt määrati EC_{50} väärtus. Kokku on tiitrid määratud 8 viirusel, mille EC_{50} väärtuse kaudu arvutatud viiruste kontsentratsioonid on esitatud tabelis (lisa 3). Töös on amplifitseeritud viiruste kontsentratsioonid tasemini, millega oli võimalik katseid teostada imetajarakkudes.

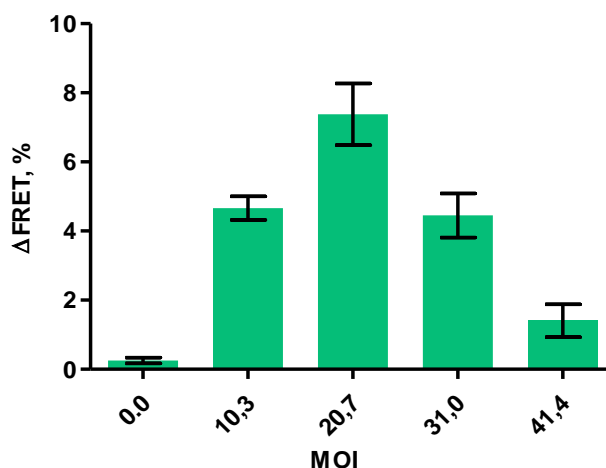


Joonis 6. Sf9 rakkude diameetri sõltuvus viiruse kontsentratsioonist. Joonisel on toodud Gst P2 kontsentratsiooni määramise eksperimentaalandmete graafik, millelt leiti EC_{50} väärtus. Katsepunktid on keskmine duplikaatide väärtus ja veajooned näitavad aritmeetilise keskmise standardhälvet.

5.3 Epac-S^{H187} biosensori taseme optimeerimine

Sobiva cAMP-i biosensori taseme leidmiseks imetajarakkudes teostati optimeerimine CHO-K1-OX1 rakuliinis. Katsetulemustest on näha, et viiruse hulga suurendamisel tõuseb ka biosensori tase rakus, mis väljendub kõrgema mõõdetava FRET-i efektiivusena kui adenülaadi tsüklaasi otseselt aktiveerida forskoliiniga (joonis 7). Teatud hulgast alates muutub viirus või viiruse lahuse valmistamisel kasutatud putukarakkude sööde raku jaoks kahjulikuks ja tekib langev trend efektiis. Järeldub, et optimaalne MOI biosensori ekspresseerimiseks jääb 20 juurde. Forskoliini doos-vastus kõveratest määrati EC_{50} väärtuseks 597 ± 57 nM, mis ei erine varasematest publitseeritud tulemustest (Klarenbeek *et al.* 2015). Esialgne optimeerimine teostati CHO-K1-OX1 rakuliinis, aga kuna selles rakuliinis pole palju endogeenseid GPCR

(Vassilatis *et al.* 2003), oli katsetesse kaasatud U2OS rakuliin, kus teadaolevalt esinevad muskariinsed, adrenergilised, dopamiini retseptorid jt (Rouillard *et al.* 2016). CHO-K1-OX1 rakuliini järgi optimeeritud biosensori viiruse tase andis katsetes isegi paremad nivood U2OS rakuliinis, mistõttu uut optimeerimist ei teostatud.

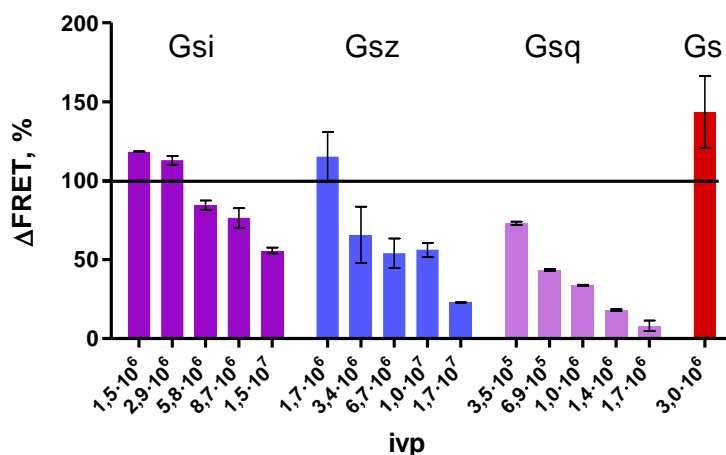


Joonis 7. Forskoliini efekti sõltuvus biosensorit Epac-S^{H187} ekspresseeriva bakuloviiruse hulgast. Esitatud on baasjoon-korrekteeritud katsetulemused, mis on mõõdetud CHO-K1-OX1 rakkudes 100 μ M forskoliini kontsentratsioonil ajahetkel 15 minutit. Graafikule on kantud ühe katse duplikaatide keskmised väärtused, veajooned näitavad duplikaatide varieeruvust.

5.4 GsX konstruktide ekspressiooni mõju rakkudele

Kui oli leitud optimaalne MOI biosensori ekspresseerimiseks, alustati katsetega GsX konstruktidega, kust ilmses teatav seaduspärasus G α allühikute perekondade vahel. G_si, aga ka G_i perekonna alla kuuluv G_sz, põhjustasid madalatel viiruste kogustel cAMP-i taseme tõusu forskoliini lisamisel (joonis 8). Seda nähtust võiks seletada sellega, et tänu kimäärsetele G-alkudele puudub G_i perekonda kuuluvate endogeensete allühikute inhibeeriv mõju adenülaadi tsüklaasile ja näitab, et G_si ja G_sz konstruktidega on võimalik signaalirada ümber suunata. Aga G_q perekonna, mis ei ole seotud adenülaadi tsüklaasi aktiivsuse regulatsiooniga, alla kuuluva konstrukti G_sq avaldumine rakus põhjustas efekti languse juba madalatel viiruste hulkadel, mis oli nähtav ka G_s15 konstrukti ekspressioonil, mis kuulub sama perekonna alla. Efekti langev trend, mis ilmneb kõrgetel GsX viiruste hulkadel, võib olla põhjustatud esialgse basaalse taseme tõusust, mis ei ole nähtav kui on teostatud ajaline normaliseerimine ühe süvendi piires. See efekt annab võimaluse arvata, et antud rakkudes on endogeensed retseptorid, mille konstitutiivne aktiivsus ei avaldu läbi Gs allühikute. Ekspresseerides rakus Gs allühikuid on

võimalik veelgi efekti suurendada. See viitab, et on antud süsteemi endogeenselt olemasolev Gs allühiku hulk võiks olla limiteeriv maksimaalse efekti saavutamisel. Sellisel viisil sai katsetatud kõik saadud kimäärsete G-valkude viirused, mis kõik põhjustasid kohese langeva trendi efektis (va Gsi ja Gsz, mis põhjustasid algse tõusu). Järgnevates katsetes on valitud GsX konstruktide viiruste kontsentratsioonid, mis nähtavalt avaldasid efekti suurusele mõju, aga veel ei takista cAMP-i signaali mõõtmist.



Joonis 8. GsX konstruktide ekspresseerimise mõju rakkudele. Graafikul on esitatud kontrollsüvendi forskoliini efekti järgi normaliseeritud tulemused. Forskoliini (100 μ M) efekt on mõõdetud U2OS rakkudes 10 minutil pärast lisamist ja antud on ühe katse duplikaatide keskmised väärtused, veajooned näitavad duplikaatide varieeruvust.

5.5 Ligandide mõju analüüs imetajarakkudes

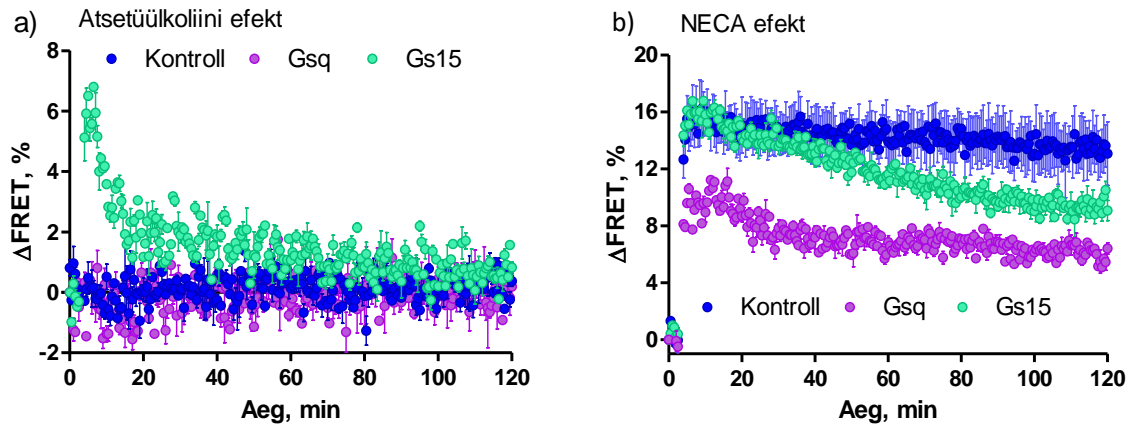
Et näidata kimäärsete G-valkude võimet ümber suunata signaaliradu, on valitud ligandid, mis aktiveerivad erinevaid $G\alpha$ allühikuid läbi U2OS rakuliinis esinevate retseptorite. Endogeensete retseptorite otsingul toetuti andmetele, mis on avaldatud Harmonizome andmebaasis (Rouillard *et al.* 2016).

Atsetüülkoliin ja karbakoliin on muskariinsete retseptorite mitteselektiivsed täisagonistid (Birdsall *et al.* 2019). Varem arvati, et muskariinsete retseptorid $M_{1,3,5}$ on seotud G_q perekonnaga, täpsemalt kas G_q või G_{11} allühikuga, ja retseptorid $M_{2,4}$ annavad signaali edasi läbi G_i ja G_o (Caulfield 1993). Uuemad katsed, mis teostati retseptoritega M_{1-4} , näitasid et G_i ja G_o on põhiliselt seostunud $M_{1,3}$ retseptoritega, G_s on $M_{1,2}$ retseptoritega, G_q on selektiivsem M_4 retseptorile ja G_{15} allühik on vähemal määral seotud kõikide retseptoritega (Avet *et al.* 2020).

Selles töös nende ligandidega läbi viidud katsetes oli nähtav lühiajaline efekt ainult Gs15 konstruktil, mille tase langes aja jooksul nivoole, mis vastab olukorrale enne ligandi lisamist (joonis 9a). Efekti kiire langus, mis tavaliselt on põhjustatud retseptori tuimestamisest, võiks sõltuda seostunud G-valgu alltööbist. Katsetes teiste konstruktidega ei esinenud kontrollist oluliselt erinevat efekti (joonis 10). See kinnitab teooriat, et Gs15 konstrukti võiks olla universaalsema seostumisvõimega (Giannone *et al.* 2010). Süsteemis kas puuduvad retseptorid, mis avaldavad mõju läbi G_q , G_i ja G_o allühikute, või on seostumisel GPCR-ga kriitilised ka muud piirkonnad peale C-terminaali.

Üldlevinud praktika cAMP-i signaali suurendamiseks on fosfodiesteraasi inhibiitori IBMX-i (3-isobutüül-1-metüülksantiin) kasutamine. Katsetes U2OS rakuliinis IBMX üksinda ei kutsunud esile olulist efekti kontrollrakkudes. Kimäärsete G-valkude ekspresseerimine üllatuslikult andis efekti läbi Gsq ja Gs15 konstruktid ja vähemal määral ka Gsi kaudu. IBMX on teadaolevalt ka adenosini retseptori A_1 antagonist, mis on seotud G_i perekonnaga (Fredholm *et al.* 2019). Hiljuti on näidatud, et antagonistid on võimelised käituma osalise agonistina sõltuvalt keskkonnatingimustest (Link *et al.* 2020) või antud rakuliinis IBMX aktiveerib A_1 -st erineva retseptori. Katsetes täheldati, et IBMX-i efekt saab olla aditiivne karbakoliini (CCh) efektiga, mida näitasid katsed Gs15 konstruktiga (joonis 10). Katsed olid läbi viidud ka forskoliini (100 μ M) ja IBMX-i (100 μ M) koosmõjul, aga need ei andnud forskoliini efektist oluliselt kõrgemat tulemust.

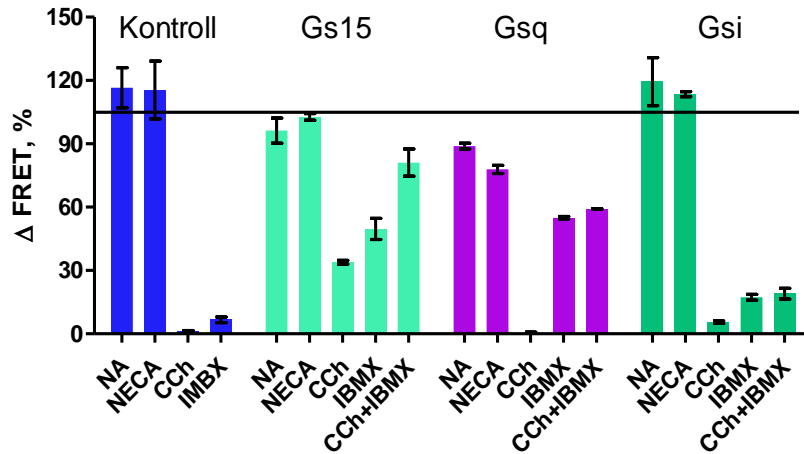
Elmised katsed näitasid, et süsteemis võivad esineda adenosinsed retseptorid. Nende retseptorite aktiveerimiseks on valitud ligand NECA (5'-N-etüülkarboksamidoadenosin). NECA on inimese rakkudes esinevate adenosini retseptorite A_{1-3} , mis on seotud G_i ja G_s perekonnaga, mitteselektiivne täisagonist (Fredholm *et al.* 2019). Katsed kontrollrakkudes tõepoolest näitasid täisagonisti efekti läbi Gs allühikute (joonis 9b), mis üldjuhul välistab GsX süsteemi kasutamise, sest G_s signaal domineerib üle kimäärsete G-valkude signaali (Ballister *et al.* 2018). Millest järeldub antud töös kasutatud cAMP-i määramise meetodi eelis- võimalus jälgida cAMP-i taseme muutust ajas. Kineetilise informatsiooni järgi on võimalik eristada endogeensete ja kimäärsete G-valkude signaale. NECA võib põhjustada kõrge efekti, mis püsib basaalsel tasemel, nagu on näha kontrollis, või lühiajalise, mis esines konstruktidel Gsq ja Gs15, mille efekt langes püsivalt kahe tunni jooksul (joonis 9b). On võimalik, et GPCR-i seotus kimäärsete G-valkudega võib põhjustada β -arrestiinide poolt indutseeritud retseptori desensitisatsiooni või sissetõmbe, mis toob kaasa efekti amplituudi vähenemise.



Joonis 9. Atsetüülkoliini ja NECA efekt cAMP-i tasemele. a) Atsetüülkoliini (100 μM) efekt kahe tunni jooksul. Katsetulemustele tehti baasjoone korrektuur ja on graafikul esitatud duplikaatide keskmiste väärtustena, veajooned näitavad duplikaatide varieeruvust. b) NECA (10 μM) efekt kahe tunni jooksul. Katsetulemustele tehti baasjoone korrektuur ja on graafikul esitatud duplikaatide keskmiste väärtustena, veajooned näitavad duplikaatide varieeruvust.

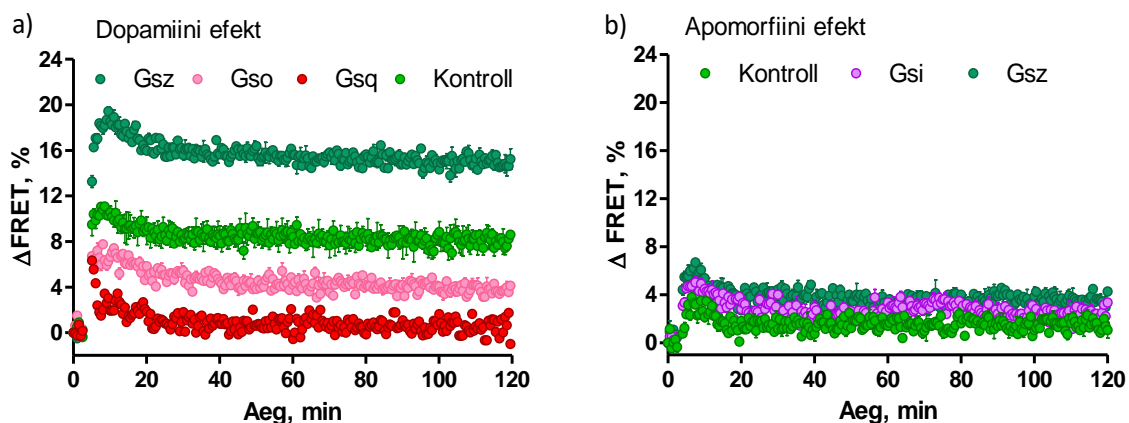
Katsetes noradrenaliiniga ei õnnestunud kineetilise informatsiooni järgi eristada signaale, mis tähendab, et antud lähenemine ei ole laiemalt rakendatav kõikidele retseptoritele. Noradrenaliin (NA) on mitteselektiivne adrenoretseptorite ja dopamiini retseptorite $D_{1,5}$ täisagonist (Altosaar *et al.* 2019; Beaulieu *et al.* 2019). Noradrenaliini efekti amplituud on võrreldav forskoliiniga, efektid ei erine üksteisest ka dünaamika poolest ja ei sõltu oluliselt GsX konstruktide ekspressioonist (joonis 10). Noradrenaliiniga saadud kõrged efektid andsid alust arvata, et süsteemis võiksid olla ka dopamiini retseptorid.

Dopamiin on mitteselektiivne dopamiini retseptorite D_{1-5} täisagonist, mille alatüübid D_{2-4} on seostunud G_i ja $D_{1,5}$ on G_s perekonnaga (Beaulieu *et al.* 2019). Dopamiin tekitab rakus lühiajalise cAMP-i taseme tõusu, mis taandus teatud basaalsele tasemele (joonis 11a). Sarnaselt katsetes noradrenaliiniga, ei ole ka dopamiini indutseeritud dünaamilise muutuse järgi võimalik eristada erinevaid G-valke, küll aga näeme erinevust efekti amplituutides ja seda ka G-valkude puhul, mis kuuluvad samasse perekonda. Valiti välja ka kolmas ligand, mis võiks aktiveerida dopamiini retseptoreid, et kinnitada funktsionaalset selektiivsust.



Joonis 10. Valitud ligandide mõju läbi erinevatele kimäärsete G-alkude. Esitatud on katsetulemused, mis on mõõdetud karbakoliini (100 μ M), IBMX-i (100 μ M), NECA (100 μ M) ja noradrenaliini (10 μ M) juuresolekul. Iga ligandi maksimaalne efekt on normaliseeritud forskoliini efekti järgi selles konstruktsis. Katsetulemustele tehti baasjoone korrektuur ja on graafikul esitatud duplikaatide keskmiste väärtustena, veajooned näitavad duplikaatide varieeruvust.

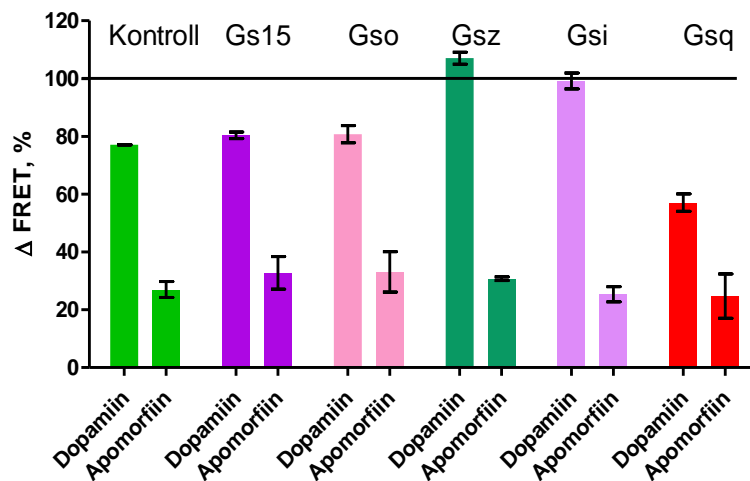
Apomorfiin, mis on enamus dopamiini retseptorite osaline agonist, andis oluliselt madalama ajutise efekti sarnase dünaamikaga (joonis 11b). Seda mõjutab osaliselt asjaolu, et apomorfiin ei seostu ainult dopamiini retseptoritele, vaid on ka adrenoretseptorite, mille olemasolu U2OS rakuliinis näitas eelmine katse, ja serotoniini retseptorite 5-HT_{1,2} (seotud G_i ja G_q perekonnaga) antagonist (Andrade *et al.* 2019; Beaulieu *et al.* 2019; Altosaar *et al.* 2019).



Joonis 11. a) Dopamiini (100 μ M) efekt kahe tunni jooksul. Katsetulemustele tehti baasjoone korrektuur ja on graafikul esitatud duplikaatide keskmiste väärtustena, veajooned näitavad duplikaatide varieeruvust. **b)** Apomorfiini (10 μ M) efekt kahe tunni

jooksul. Katsetulemustele tehti baasjoone korrektuur ja on graafikul esitatud duplikaatide keskmiste väärtustena, veajooned näitavad duplikaatide varieeruvust.

Dopamiini efekt oli ka kontrollis, järelikut on dopamiin võimeline aktiveerima endogeenseid G_s allühikuid, kuigi efekt ei saavutanud forskoliiniga määratud nivood (joonis 12). Apomorfiini efekt ei erine oluliselt kontrollist üheski konstruktis. Gso ja Gs15 ekspresseerimine rakus ei andnud kontrollist erinevat tulemust dopamiini ega apomorfiini juuresolekul, vastupidiselt Gsz ja Gsi konstruktile, millega on õnnestunud saada tunduvalt kõrgemad efektid. Gsz ja Gso kuuluvad mõlemad G_i perekonna alla, aga efekti amplituud erineb oluliselt, mis näitab, et antud meetodis on võimalik saavutada selektiivsus üksikute G-valkude vahel. Kuigi Gso kuulub G_i perekonna alla, mis võiks olla seostunud dopamiini retseptoriga, ei esinenud efekti tõusu võrreldes kontrolliga üheski katses, mis võib tähendada, et dopamiini retseptorid on selektiivsed $G\alpha$ allühiku suhtes perekonna-siseselt. Sarnase tulemuse andis Gs15 avaldamine rakus, aga mis kuulub G_q perekonda, mis teadaolevalt ei ole seostunud dopamiini retseptoritega (Avet *et al.* 2020). Gsq ekspresseerimine langetas efekti nii dopamiini kui ka apomorfiini mõjul. On võimalik, et Gsq konstruktid konkureerivad rakus endogeensete G_s allühikutega, aga ise seostudes signaali edasi ei anna, mis langetab cAMP-i taset rakus.



12. Dopamiini ja apomorfiini mõju läbi erinevate GsX konstruktide. Dopamiini (100 μ M) ja apomorfiini (10 μ M) maksimaalsed efektid, mis on normaliseeritud forskoliini efekti järgi igas konstruktis. Katsetulemustele tehti baasjoone korrektuur ja on graafikul esitatud duplikaatide keskmiste väärtustena, veajooned näitavad duplikaatide varieeruvust.

6 KOKKUVÕTE

Käesolevas bakalaureusetöös käsitleti kimäärsete GsX valkude rakendamist GPCR vahendatud signaaliülekanne uurimiseks imetajarakkudes. Teoreetilises osas anti ülevaade signaaliülekanne üldprintsipidest ja toodi välja raskused nende uurimisel. Arutleti lähemalt G-valkude rollist signaaliülekanne ja nende modifitseerimise võimalustest, millega on võimalik loomulikke signaaliradu ümber suunata cAMP-i tekkeks. Analüüsiti erinevaid cAMP-i mõõtmise meetodeid ja kuidas neid saab elusrakkudes rakendada, kasutades biotehnoloogilisi viise, peamiselt BacMam tehnoloogiat.

Praktilise töö raames on geenitehnoloogiliste meetoditega loodud üheksa uut rekombinantset bakuloviirust, mis võimaldavad imetajarakkudes ekspresseerida kimäärseid G-valke. Need GsX konstruktid hõlmavad peaaegu kogu heterotrimeersete G-valkudega aktiveeritava GPCR signalosoomi. Kaheksa konstrukti korral õnnestus näidata erinevat trendi nende võimes indutseerida cAMP-i signaali. Sidumiskatsetes täheldati osadel ligandidel ootamatuid efekte, mis erinesid varem publitseeritud tulemustest. On toodud näiteid, kuidas kineetilise informatsiooni kasutamine võimaldab ületada takistusi, mis tekivad, kui ligand aktiveerib endogeenseid G-valke ja põhjustab läbi nende cAMP-i taseme tõusu. Ühe retseptori perekonna piires, mille alatüüpidele on seostunud erineva afiinsusega G-valgud, õnnestus näidata funktsionaalset selektiivsust.

Katsetulemused kinnitavad, et on uut GsX-Epac-BacMam süsteemi saab kasutada GPCR-de reguleeritud signaaliradade uurimiseks. Kuna süsteem on universaalne, saab seda potentsiaalselt rakendada retseptorsüsteemide uurimiseks, näiteks kõrge tootlikusega sõeluuringutes orb-retseptorite ligandide leidmisel. Edasisel ühendamisel MultiBacMam tehnoloogiaga, mis võimaldab ühte genoomi ühildada biosensori, kimäärsete G-valkude ja lisaks veel uuritava retseptori ja Gβγ valkude geenid, muudab meetodi kasutamise oluliselt lihtsamaks.

7 SUMMARY

The Bachelor's thesis presents GsX assay, based on chimeric Gs subunits, which allows to convert diverse cellular signals into the increase of intracellular cAMP level. The thesis theoretical part reviewed GPCR mediated signaling pathways with an emphasis on G-proteins and their modifications. Different cAMP detection methods have been analyzed and it was discussed how they can be applied in living cells using biotechnology methods, primary BacMam technology.

In this work, nine new recombinant baculovirus genomes have been created by molecular engineering methods to allow the expression of chimeric GsX proteins in mammalian cells. Those chimeras covers almost the entire GPCR signalingosome activated by heterotrimeric G proteins. Eight viruses were able to demonstrate different patterns in their ability to modulate the cAMP signal. With some ligands we also observed an unexpectedly complex response profile. Examples was provided of how the use kinetic information could allows to overcome the obstacles that arise when a ligand activates cAMP generation through its natural Gs pathway. Using the same family of receptors, but ligands with different binding selectivity, we also demonstrated functional selectivity with new method.

The experimental results confirm that a new GsX-Epac-BacMam system can be used to study signaling pathways mediated by GPCRs. Because the system is universal, it can potentially be used in pharmacology, such as high-throughput screening to identify ligands of orphan receptors. Further integration with MultiBacMam technology, which allows the genes of the biosensor, chimeric G proteins and also the receptor and G $\beta\gamma$ proteins combination into one genome, makes the method much easier to use in future.

8 KASUTATUD KIRJANDUS

1. Altosaar K., Balaji P., Bond R. A., Bylund D. B., Cotecchia S., Devost D., Doze V. A., et al. (2019) Adrenoceptors (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. *IUPHAR/BPS Guid. to Pharmacol. CITE* **2019**.
2. Andrade R., Barnes N. M., Baxter G., Bockaert J., Branchek T., Butler A., Cohen M. L., et al. (2019) 5-Hydroxytryptamine receptors (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. *IUPHAR/BPS Guid. to Pharmacol. CITE* **2019**.
3. Avet C., Mancini A., Breton B., Gouill C. Le, Alexander S., Normand C., Kobayashi H., et al. (2020) Selectivity Landscape of 100 Therapeutically Relevant GPCR Profiled by an Effector Translocation-Based BRET Platform. *BioRxiv Pre-Print*, 1–41.
4. Ballister E. R., Rodgers J., Martial F., Lucas R. J. (2018) A live cell assay of GPCR coupling allows identification of optogenetic tools for controlling Go and Gi signaling. *BMC Biol.* **16**, 1–16.
5. Beaulieu J.-M., Borrelli E., Carlsson A., Caron M. G., Civelli O., Espinoza S., Fisone G., et al. (2019) Dopamine receptors (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. *IUPHAR/BPS Guid. to Pharmacol. CITE* **2019**.
6. Bindslev N. (2008) *Drug-Acceptor Interactions*. CRC Press.
7. Birdsall N. J. M., Bradley S., Brown D. A., Buckley N. J., Challiss R. A. J., Christopoulos A., Eglen R. M., et al. (2019) Acetylcholine receptors (muscarinic) (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. *IUPHAR/BPS Guid. to Pharmacol. CITE* **2019**.
8. Brady S. T., Siegel G. J., Albers R. W., Price D. L. (2012) *Basic Neurochemistry*, (Brady S., Siegel G., Albers R. W., Price D., eds). Elsevier Academic Press.
9. Brown T. A. (2010) *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction, 7th Edition*. Hoboken: Wiley-Blackwell.
10. Caulfield M. P. (1993) Muscarinic Receptors-Characterization, coupling and function. *Pharmacol. Ther.* **58**, 319–379.
11. Coward P., Chan S. D. H., Wada H. G., Humphries G. M., Conklin B. R. (1999) Chimeric G Proteins Allow a High-Throughput Signaling Assay of Gi-Coupled Receptors. *Anal. Biochem.* **270**, 242–248.
12. Daniels C. K., Zhang L., Musser B., Vestal R. E. (1994) A solid-phase radioimmunoassay for cyclic AMP. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **31**, 41–46.

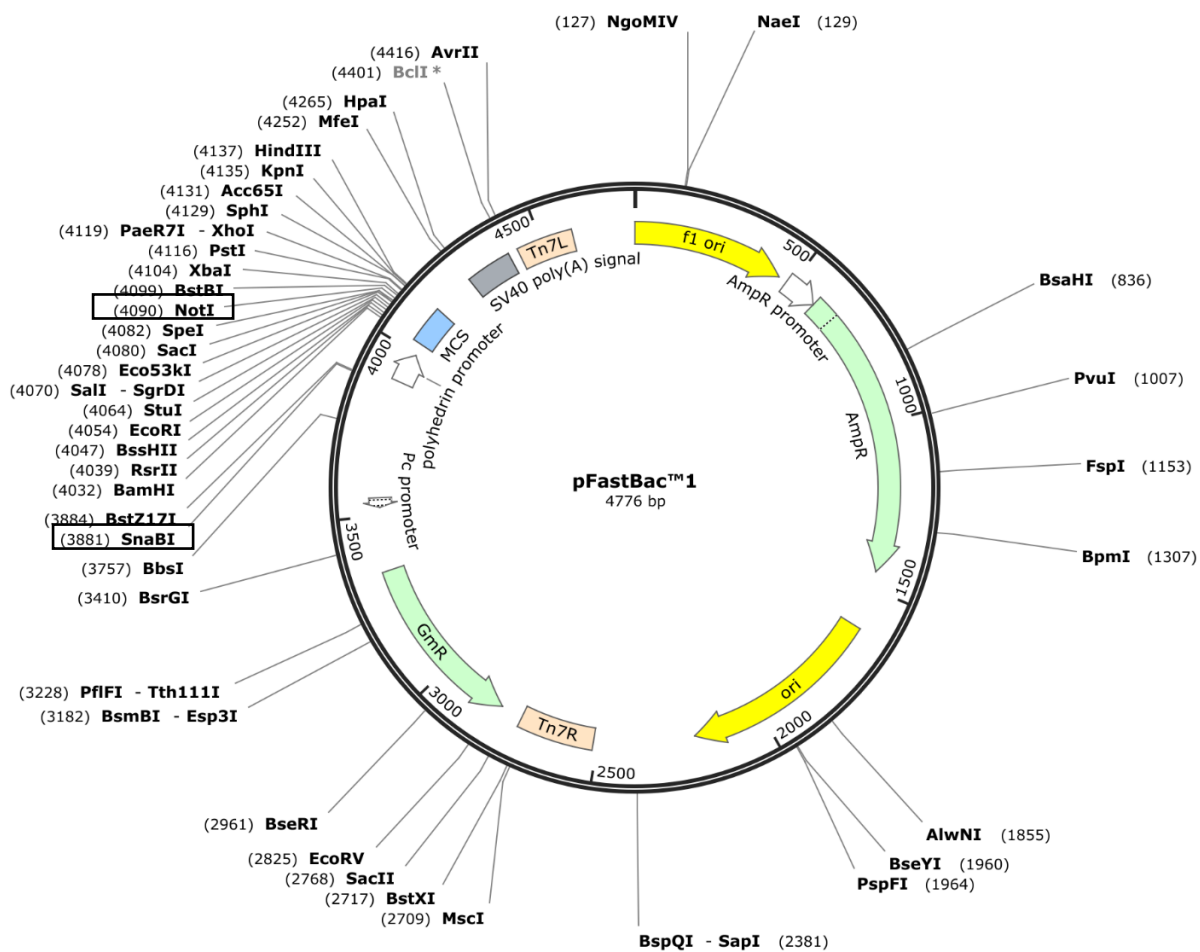
13. Dorsam R. T., Gutkind J. S. (2007) G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 79–94.
14. Flock T., Ravarani C. N. J., Sun D., Venkatakrishnan A. J., Kayikci M., Tate C. G., Veprintsev D. B., Babu M. M. (2015) Universal allosteric mechanism for G α activation by GPCRs. *Nature* **524**, 173–179.
15. Fredholm B. B., Frenguelli B. G., Hills R., IJzerman A. P., Jacobson K. A., Klotz K.-N., Linden J., Müller C. E., Schwabe U., Stiles G. L. (2019) Adenosine receptors (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. *IUPHAR/BPS Guid. to Pharmacol. CITE* **2019**.
16. García-Nafria J., Nehmé R., Edwards P. C., Tate C. G. (2018) Cryo-EM structure of the serotonin 5-HT_{1B} receptor coupled to heterotrimeric Go. *Nature* **558**, 620–623.
17. Giannone F., Malpeli G., Lisi V., Grasso S., Shukla P., Ramarli D., Sartoris S., et al. (2010) The puzzling uniqueness of the heterotrimeric G₁₅ protein and its potential beyond hematopoiesis. *J. Mol. Endocrinol.* **44**, 259–269.
18. Gilman A. G. (1970) A Protein Binding Assay for Adenosine 3':5'-Cyclic Monophosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **67**, 305–312.
19. Hauser A. S., Gloriam D. E., Bräuner-Osborne H., Foster S. R. (2020) Novel approaches leading towards peptide GPCR de-orphanisation. *Br. J. Pharmacol.* **177**, 961–968.
20. Hu G. M., Mai T. L., Chen C. M. (2017) Visualizing the GPCR Network: Classification and Evolution. *Sci. Rep.* **7**, 1–15.
21. Janakiraman V., Forrest W. F., Chow B., Seshagiri S. (2006) A rapid method for estimation of baculovirus titer based on viable cell size. *J. Virol. Methods* **132**, 48–58.
22. Klarenbeek J., Goedhart J., Batenburg A. Van, Groenewald D., Jalink K. (2015) Fourth-generation Epac-based FRET sensors for cAMP feature exceptional brightness, photostability and dynamic range: Characterization of dedicated sensors for FLIM, for ratiometry and with high affinity. *PLoS One* **10**, 1–11.
23. Kost T. A., Condreay J. P. (2002) Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors. *Trends Biotechnol.* **20**, 173–180.
24. Krogt G. N. M. Van der, Ogink J., Ponsioen B., Jalink K. (2008) A comparison of donor-acceptor pairs for genetically encoded FRET sensors: Application to the Epac cAMP sensor as an example. *PLoS One* **3**.
25. Laasfeld T., Kopanchuk S., Rinken A. (2017) Image-based cell-size estimation for baculovirus quantification. *Biotechniques* **63**, 161–168.
26. Lakowicz J. R. (2006) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, (Lakowicz J. R., ed).

Springer US, Boston, MA.

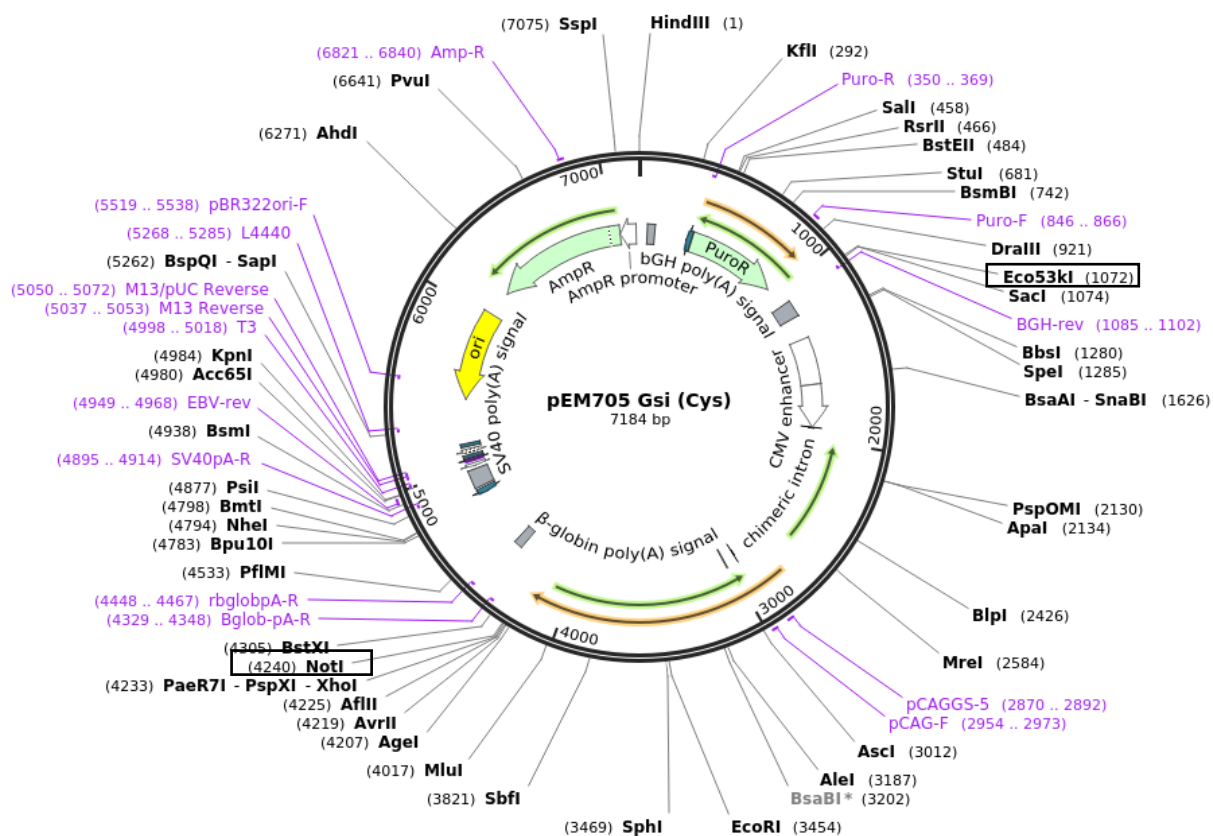
27. Link R., Veiksina S., Tahk M., Laasfeld T., Paiste P., Kopanchuk S., Rinken A. (2020) The constitutive activity of melanocortin-4 receptors in cAMP pathway is allosterically modulated by zinc and copper ions. *J. Neurochem.* **153**, 346–361.
28. Lodish H., Berk A., Kaiser C. A., Amon A., Ploegh H., Bretscher A., Krieger M., Kelsey C M. (2016) *Molecular Cell Biology (8th Edition)*, (Champion E., Moffat H., eds). Katherine Ahr Parker, New York.
29. Nehmé R., Carpenter B., Singhal A., Strege A., Edwards P. C., White C. F., Du H., Grisshammer R., Tate C. G. (2017) Mini-G proteins: Novel tools for studying GPCRs in their active conformation The first mini-G protein developed was mini-G s. Here we extend the family of mini-G proteins to include mini-G olf , mini-G il , mini-G ol and the chimeras mini-G s/q and mini-G. *PLoS One*, 1–26.
30. Nikolaev V. O., Bünemann M., Hein L., Hannawacker A., Lohse M. J. (2004) Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J. Biol. Chem.* **279**, 37215–37218.
31. Okashah N., Wan Q., Ghosh S., Sandhu M., Inoue A., Vaidehi N. (2019) Variable G protein determinants of GPCR coupling selectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 12054–12059.
32. Ponsioen B., Zhao J., Riedl J., Zwartkruis F., Krogt G. van der, Zaccolo M., Moolenaar W. H., Bos J. L., Jalink K. (2004) Detecting cAMP-induced Epac activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as a novel cAMP indicator. *EMBO Rep.* **5**, 1176–1180.
33. Roldão A., Oliveira R., Carrondo M. J. T., Alves P. M. (2009) Error assessment in recombinant baculovirus titration: Evaluation of different methods. *J. Virol. Methods* **159**, 69–80.
34. Rouillard A. D., Gundersen G. W., Fernandez N. F., Wang Z., Monteiro C. D., McDermott M. G., Ma'ayan A. (2016) The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. *Database* **2016**, baw100.
35. Smith J. S., Rajagopal S. (2016) The β -Arrestins: Multifunctional regulators of G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* **291**, 8969–8977.
36. Sprenger J. U., Nikolaev V. O. (2013) Biophysical techniques for detection of cAMP and cGMP in living cells. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 8025–8046.
37. Sriram K., Insel P. A. (2018) G protein-coupled receptors as targets for approved drugs: How many targets and how many drugs? *Mol. Pharmacol.* **93**, 251–258.
38. Vassilatis D. K., Hohmann J. G., Zeng H., Li F., Ranchalis J. E., Mortrud M. T., Brown A.,

- et al. (2003) The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 4903–4908.
39. Vsevolod K., Vadim C., C. Stevens R. (2013) Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **53**, 531–556.
40. Wootten D., Christopoulos A., Marti-Solano M., Babu M. M., Sexton P. M. (2018) Mechanisms of signalling and biased agonism in G protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 638–653.
41. Zalewska M., Siara M., Sajewicz W. (2014) G protein-coupled receptors: Abnormalities in signal transmission, disease states and pharmacotherapy. *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.* **71**, 229–243.

9 LISAD



Lisa 1. pFastBac1 vektorikaart. Plasmidi lõigati restriktasidga FD NotI ja FD Eco105I, mille lõikesaidid on vektorikaardil märgitud musta kastiga. SnaBI on Eco105I isomeer, mis tunneb ära lõikamiseks sama järjestuse (5' TAC↓GTA 3', tõmbi otsaga). Kasutades neid restriktase on eeldatavad produkti suurused 209 ja 4567 bp (aluspaari) (Invitrogen).



Lisa 2. pEM705 Gsi (S) vektorikaart. Kõiki pEM705_GsX plasmide lõigati restriktasidtega FD NotI ja FD Ecl136II, lõikesaidid märgitud musta kastiga. Sõltuvalt järjestusest olid soovitud lõikeproduktide suurused mõnevõrra erinevad, varieerudes 3142-3168 bp (Ballister *et al.* 2018).

Viirus	Log (ivp/ml)
H187 P3	7,69 ± 0,09
Gs P1	7,99 ± 0,16
Gsz P1	7,40 ± 0,15
Gsi (S) P2	7,46 ± 0,11
Gso (S) P2	7,96 ± 0,08
Gst (S) P2	8,33 ± 0,07
Gs13 P2	8,52 ± 0,09
Gsq P2	8,67 ± 0,13
Gs15 P2	8,65 ± 0,09
Gs12	-

Lisa 3. Tabel 1. GsX konstrukte, endogeenset Gs ja Epac-S^{H187} sensorit kodeeriva bakuloviiruste kontsentratsioonid. Gs12 on ainuke viirus, millel ei õnnestunud määrata tiitrit.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Elen Laaneväli,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose,

“Erinevate G-valk seotud retseptorite signaaliradade koondamine cAMP väljundiks, kasutades kimäärseid G-valke ja BacMam tehnoloogiat“

mille juhendajad on Santa Veikšina ja Sergei Kopantsuk,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Elen Laaneväli

28.05.2020